

Développement d'une approche par séquençage de nouvelle génération pour l'étude de la diversité fongique des bioaérosols

Hamza Mbareche
Marc Veillette
Marie-Ève Dubuis
Laetitia Bonifait
Guillaume J. Bilodeau
Caroline Duchaine

RAPPORTS
SCIENTIFIQUES

R-1019

NOS RECHERCHES travaillent pour vous !

Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour.
De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement.
www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement :

- au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par l'Institut et la CNESST (preventionautravail.com)
- au bulletin électronique [InfoIRSST](#)

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2018
ISBN : 978-2-89797-012-3
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
et de la valorisation de la recherche
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
juin 2018

Développement d'une approche par séquençage de nouvelle génération pour l'étude de la diversité fongique des bioaérosols

Hamza Mbareche^{1,3}, Marc Veillette¹, Marie-Ève Dubuis^{1,3},
Laetitia Bonifait¹, Guillaume J. Bilodeau² et Caroline Duchaine^{1,2}

¹Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie
et de pneumologie de Québec

²Agence canadienne d'inspection des aliments

³Université Laval

RAPPORTS
SCIENTIFIQUES

R-1019



Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document.

En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

Cette publication est disponible en version PDF sur le site Web de l'IRSST.



ÉVALUATION PAR DES PAIRS

Conformément aux politiques de l'IRSST, les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent tout particulièrement à remercier les gestionnaires et le personnel des sites de compostage, des deux usines de biométhanisation et des fermes laitières qui leur ont donné accès à leurs installations lors des campagnes d'échantillonnage. Ils expriment également leur reconnaissance envers le personnel de l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) pour leur soutien lors de l'échantillonnage des sites de compostage et des usines de biométhanisation.

Les auteurs manifestent aussi leur gratitude envers le laboratoire de Guillaume Bilodeau pour l'accueil durant le stage de courte durée de Hamza Mbareche, qui lui a permis une introduction à l'analyse bio-informatique.

Hamza Mbareche est récipiendaire d'une bourse d'études au doctorat du Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT), d'une bourse du Réseau en santé respiratoire du Fonds de recherche du Québec – Santé et d'une bourse du Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA). Pour sa part, Marie-Ève Dubuis a obtenu une bourse du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour ses études de maîtrise.

SOMMAIRE

L'exposition aux bioaérosols de différents milieux de travail n'est pas étrangère au développement de maladies respiratoires; les moisissures y tiendraient d'ailleurs un rôle important. De par les activités qui y sont menées, certains milieux de travail génèrent de grandes quantités d'aérosols (incluant des moisissures), qui proviennent de la matière présente dans l'environnement. Des facteurs, tels que l'humidité relative et le type de ventilation du bâtiment peuvent accentuer l'effet de l'exposition aux moisissures dans les environnements touchés. La présence de moisissures dans l'air a d'abord été confirmée par l'emploi de méthodes d'analyse par culture. Ces méthodes dites classiques induisent un biais dans la représentation de la diversité fongique tant au niveau qualitatif que quantitatif. En effet, les méthodes d'analyse par culture ne permettent pas d'évaluer les risques réels auxquels font face les travailleurs lorsqu'ils sont en présence de moisissures non viables et/ou non cultivables dans les bioaérosols. Cela présente une lacune importante dans les connaissances disponibles concernant la diversité fongique des bioaérosols. Contrairement à la culture et à la quantification par amplification avec réaction en chaîne par polymérase (PCR) spécifique, les méthodes d'analyse taxonomiques à l'aide du séquençage d'ADN de nouvelle génération permettent d'étudier quantitativement et qualitativement la diversité fongique de l'air. Ces nouvelles approches de séquençage à haut débit nécessitent l'utilisation d'un segment standardisé du génome afin de pouvoir dresser un profil de diversité pour chaque échantillon. Pour l'étude des bactéries, le marqueur universel utilisé est le gène codant pour l'ARNr 16S. Toutefois, l'utilisation des séquences d'ADN pour identifier les moisissures se heurte au problème du choix de la région du génome à utiliser. À défaut d'avoir une région génomique parfaite, les différentes séquences proposées comme marqueurs universels fongiques et étudiées par la communauté scientifique depuis plusieurs années, présentent chacune des avantages et des inconvénients. Le gène codant pour la région ITS (*Internal Transcribed Spacer*) est le marqueur fongique universel choisi par le Consortium for the Barcode of Life (CBOL). L'ITS est une région située sur l'ADN génomique des eucaryotes entre les gènes codant pour l'ARNr 28S et 18S. Elle est composée de trois sous-régions : l'ITS1, l'ITS2 et le gène 5.8S.

Afin d'explorer l'association entre les bioaérosols, l'exposition aux moisissures et les effets sur la santé respiratoire, l'objectif général de cette activité de recherche était de proposer une méthode d'analyse permettant de déterminer, de manière quantitative, la diversité fongique des bioaérosols, sans égard à leur culture. D'une manière plus spécifique, deux marqueurs génomiques fongiques ont été ciblés par l'approche de séquençage de nouvelle génération, soit l'ITS1 et l'ITS2, afin de comparer leur efficacité à décrire la diversité fongique d'un environnement.

Pour ce faire, l'air contaminé particulièrement par la présence de moisissures a été échantillonné dans trois environnements de travail. Les sites de compostage et de biométhanisation ont été utilisés afin de mettre au point la méthodologie de traitement des échantillons ainsi que les régions de l'ADN fongique à cibler pour obtenir une grande diversité. Par la suite, un environnement pilote (fermes laitières) a été utilisé afin de comparer la performance de la méthode à celle des techniques classiques de culture.

Les millions de séquences obtenues à la suite du séquençage de l'ADN extrait des échantillons ont été traitées à l'aide d'un protocole bio-informatique développé de façon spécifique pour le projet. Les résultats indiquent une richesse et une diversité fongiques plus élevées lors de

l'utilisation du gène codant pour la région ITS1. Ils ont été confirmés lors de l'application de l'approche développée pour le compost aux échantillons prélevés dans des usines de biométhanisation. La robustesse de cette méthode a permis de décrire l'exposition des travailleurs dans ces deux environnements caractérisés par le traitement des déchets. L'identification de genres de moisissures ayant un potentiel pathogène ou allergène dans l'air échantillonnés dans des environnements de travail suggère la nécessité d'utiliser des moyens de protection pour les travailleurs. Par la suite, l'adaptation de l'approche élaborée, incluant le protocole bio-informatique de traitement des données et l'analyse de l'écologie microbienne, a permis de décrire la composition fongique de l'environnement pilote. Les cinq fermes laitières échantillonnées présentaient un profil fongique différent, démontrant l'influence du type de bâtiment et de l'alimentation des vaches sur la composition fongique des échantillons d'air. Les méthodes de culture ont permis la description de certaines espèces non détectées par les méthodes de séquençage, phénomène bien décrit en bactériologie. Toutefois, la richesse et la diversité sont très faibles en utilisant les méthodes de culture. Ces méthodes omettent un grand nombre de genres de moisissures dans leur description de la diversité fongique des bioaérosols.

Complémentaire de la technique d'usage actuel, la méthodologie développée a permis d'obtenir un portrait beaucoup plus exhaustif et précis de la biodiversité fongique de l'air et de mieux comprendre les forces, les faiblesses et la complémentarité des méthodes disponibles. Elle pourra être utilisée dans l'étude de la diversité fongique des bioaérosols de l'air intérieur et extérieur.

L'utilisation de cette approche dans un nombre grandissant de protocoles et d'environnements permettra de documenter un aspect essentiel à la compréhension du rôle des moisissures présentes dans l'air, en lien avec les maladies pulmonaires professionnelles, en plus de fournir des données solides qui sont essentielles aux études d'exposition humaine aux bioaérosols.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
1. INTRODUCTION	1
1.1 Effet des moisissures sur la santé humaine	1
1.2 Bilan des milieux de travail touchés par la présence fongique dans l'air	2
1.3 Milieu modèle pour l'étude de la biodiversité fongique : traitement des déchets organiques	3
1.3.1 Sites de compostage	3
1.3.2 Usines de biométhanisation	4
1.4 Lacunes dans l'étude de la biodiversité fongique des bioaérosols	4
1.5 Séquençage nouvelle génération et diversité fongique	5
1.6 Environnement pilote pour la comparaison des méthodes d'étude de la diversité fongique des bioaérosols : fermes laitières	5
2. ÉTAT DES CONNAISSANCES	7
3. OBJECTIFS DE RECHERCHE	9
4. MÉTHODOLOGIE	11
4.1 Échantillonnage-terrain	11
4.1.1 Sites de compostage	11
4.1.2 Usines de biométhanisation	11
4.1.3 Fermes laitières	11
4.2 Échantillonneur d'air	12
4.3 Diversité fongique par méthode de culture	12
4.4 Identification des moisissures isolées par culture	12
4.5 Optimisation de la méthode d'extraction de l'ADN fongique	13
4.5.1 Consortium microbien pour l'évaluation de différentes conditions de concentration des spores fongiques	13
4.5.2 Protocole de centrifugation standard	13

4.5.3	Protocole de filtration nouvellement développé.....	13
4.5.4	Application de la méthode sur les échantillons d'air des usines de biométhanisation	14
4.5.5	Extraction de l'ADN	14
4.5.6	Quantification PCR en temps réel.....	14
4.6	Séquençage de nouvelle génération (MiSeq Illumina)	14
4.7	Protocole bio-informatique pour le traitement des séquences	15
5.	RÉSULTATS.....	17
5.1	Comparaison des régions ITS1 et ITS2 dans les échantillons de compost	17
5.1.1	Diversité alpha (indice de richesse et de diversité)	17
5.1.2	Analyse taxonomique	20
5.2	Optimisation du rendement de la méthode d'extraction de l'ADN fongique et de son applicabilité à des échantillons d'air provenant des usines de biométhanisation.....	24
5.2.1	Consortium microbien.....	24
5.2.2	Échantillons d'air des usines de biométhanisation	24
5.3	Application de l'approche SNG aux échantillons d'air des usines de biométhanisation.....	26
5.3.1	Classe des moisissures identifiées dans l'air des deux usines de biométhanisation	26
5.3.2	Genre des moisissures identifiées dans l'air des deux usines de biométhanisation	27
5.4	Application de l'approche dans les fermes laitières	29
5.4.1	Classe des moisissures identifiées dans l'air des cinq fermes laitières	29
5.4.2	Comparaison des genres de moisissures identifiées par SNG et par culture	30
6.	DISCUSSION	33
6.1	Sites de compostage	33
6.2	Optimisation du rendement d'extraction de l'ADN fongique.....	33
6.3	Application de la procédure SNG aux échantillons d'air provenant des usines de biométhanisation.....	34
6.4	Fermes laitières	35
6.5	Limites et contraintes	36
6.6	La portée et l'applicabilité des résultats.....	37
7.	CONCLUSION.....	39
	BIBLIOGRAPHIE	41
	ANNEXE A.....	47
	ANNEXE B.....	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Solution Master-mix pour réaction d'amplification de la région ITS	47
Tableau 2 :	Amorces et sondes utilisées pour l'amplification des microorganismes sélectionnés	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Comparaison des indices de diversité α obtenus par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 des échantillons provenant des sites de compostage (animal et domestique).....	18
Figure 2 :	Comparaison des indices de diversité α obtenus par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 provenant du compost domestique.	19
Figure 3 :	Comparaison des indices de diversité α obtenus par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 provenant du compost animal.	20
Figure 4 :	Abondance relative des classes de moisissures obtenues par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 des échantillons provenant des sites de compostage (animal et domestique).	21
Figure 5 :	Abondance relative des classes de moisissures obtenues par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 provenant du compost domestique.	22
Figure 6 :	Abondance relative des classes de moisissures obtenues par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 provenant du compost animal.	22
Figure 7 :	Abondance relative des genres de moisissures identifiées par le séquençage des régions ITS1 et ITS2.....	23
Figure 8 :	Concentration de <i>Penicillium</i> et d' <i>Aspergillus</i> (PenAsp) en utilisant les protocoles de centrifugation et de filtration sur les échantillons de consortium microbien.....	24
Figure 9 :	Concentration de <i>Penicillium</i> et d' <i>Aspergillus</i> (PenAsp) obtenue par l'application des protocoles de centrifugation et de filtration sur les bioaérosols de deux usines de biométhanisation.	25
Figure 10 :	Nombre d'UTO observées dans les échantillons de bioaérosols récoltés à l'aide du Coriolis dans les usines de biométhanisation, selon le protocole d'extraction utilisé.....	26
Figure 11 :	Abondance relative des classes de moisissures identifiées dans l'air des deux usines de biométhanisation (UB1 et UB2) en été et en hiver.....	27
Figure 12 :	Les 20 genres de moisissures les plus abondants dans chacune des visites de l'usine UB1.	28
Figure 13 :	Les 20 genres de moisissures les plus abondants dans chacune des visites de l'usine UB2.	29
Figure 14 :	Abondance relative des classes de moisissures identifiées dans l'air des cinq fermes laitières.....	30
Figure 15 :	Abondance relative des genres de moisissures identifiés par l'approche moléculaire (SNG) et par culture dans l'air des cinq fermes laitières.	31

LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ITS :	Internal Transcribed Spacer (espace interne transcrit)
FL :	Ferme laitière
qPCR :	Réaction en chaîne par polymérase quantitative
SNG :	Séquençage de nouvelle génération
UTO :	Unité taxonomique opérationnelle
UFC :	Unité formatrice de colonies
UB :	Usine de biométhanisation

1. INTRODUCTION

Les bioaérosols représentent une source importante de contamination de l'air intérieur et extérieur. Dans les pays développés, un travailleur passe environ 90 % de son temps dans un environnement intérieur, ce qui a pour effet d'augmenter l'interaction entre les humains et les microorganismes (Höppe et Martinac, 1998). De plus, certains milieux de travail favorisent la génération de bioaérosols par le type de production et de méthodologie utilisée par l'entreprise. Ainsi, que ce soit par l'air extérieur, le genre d'industrie ou la présence d'autres facteurs tels que l'humidité et le type de ventilation, les sources de bioaérosols posent un problème pour la santé respiratoire des occupants (Douwes *et al.*, 2003; Srikanth *et al.*, 2008). La composition microbiologique de l'air est un sujet d'actualité depuis les dernières années. Parmi les microorganismes composant les bioaérosols, les moisissures semblent jouer un rôle important sur le plan des effets nocifs sur la santé. Bien que dans certains cas leur implication ne soit pas claire, l'exposition humaine aux populations fongiques est associée à un grand nombre de pathologies (Portnoy *et al.*, 2005; Husman, 1996; Fung et Clark, 2004; Crook et Burton, 2010). Depuis quelques années, les professionnels de la santé publique mentionnent l'intérêt de concentrer l'étude de l'exposition humaine aux microorganismes dans l'air, plus particulièrement aux moisissures (Meheust *et al.*, 2014).

1.1 Effet des moisissures sur la santé humaine

Environ 1,5 million de personnes meurent chaque année à la suite d'une exposition aux moisissures (WHO, 2009). Plusieurs problèmes de santé sont reliés à l'exposition des humains aux différents types de moisissures. En effet, certaines moisissures sont des pathogènes opportunistes qui profitent de l'affaiblissement du système immunitaire humain pour transmettre des maladies comme c'est le cas d'*Aspergillus fumigatus* qui est responsable de l'aspergillose, une infection des voies respiratoires (Latgé, 1999). En plus de son activité infectieuse, *A. fumigatus* est un allergène impliqué dans des maladies allergiques pulmonaires telle la maladie du poumon du fermier. Cette activité allergène fait en sorte qu'une exposition répétée peut mener à diverses conséquences telles que l'asthme ou l'alvéolite allergique (Swan *et al.*, 2003). Aussi, les moisissures produisent des métabolites secondaires, appelés mycotoxines, qui peuvent entraîner des conséquences sur la santé respiratoire et la santé en général (Fung et Clark, 2004). Dans d'autres cas, ces mycotoxines, appelées aflatoxines et produites par certaines espèces d'*Aspergillus*, sont également susceptibles d'augmenter les risques de cancer chez l'humain (Georgianna et Payne, 2009). De plus, les moisissures produisent également des « composés organiques volatils microbiens » (COVM) qui causent des symptômes comme la sensation de brûlure dans les yeux, dans la partie supérieure des voies respiratoires et sur la peau ainsi que des symptômes généraux tels que des maux de tête et de la fatigue (Pasanen *et al.*, 1998). De récentes études ont rapporté la possibilité d'une association entre l'exposition aux COVM à long terme et le cancer des poumons (Villeneuve *et al.*, 2013). En plus de ces agents pathogènes produits par les membres de la population fongique, il y a aussi le β -(1-3)-D glucane, un composant de la paroi cellulaire des moisissures et de certaines levures, qui est utilisé dans certains cas comme indicateur de poussière organique dans les milieux de travail et comme indicateur de présence fongique (Rylander, 1999). À forte concentration, il est suspecté d'avoir des effets néfastes sur la santé, comme une inflammation pulmonaire, une augmentation de la sensibilité aux endotoxines, une granulomatose pulmonaire ou une embolie pulmonaire (Rylander, 1996; Zekovic *et al.*, 2005; Fogelmark *et al.*, 1994).

Plusieurs pathologies liées aux moisissures ont été suggérées ces dernières années et peu de liens de cause à effet directs ont été démontrés. En effet, la présence de moisissures difficiles à détecter représente une limite dans la mise en évidence objective du lien entre les maladies respiratoires et la présence de moisissures (Bush *et al.*, 2006; Tischer et Heinrich, 2013).

1.2 Bilan des milieux de travail touchés par la présence fongique dans l'air

Plusieurs activités industrielles peuvent mener à une exposition abondante aux moisissures. À titre d'exemple, des problèmes de santé chez les travailleurs d'usines de compost ont été signalés et la présence d'une population fongique dans les bioaérosols émanant des piles de compost pourrait y jouer un rôle, en particulier pour les espèces appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus* (p. ex., *A. fumigatus*) (Wouters *et al.*, 2006; Bünker *et al.*, 2000). Effectivement, les sites de compost sont une source importante de moisissures en raison de leur importance dans le processus de compostage et leur diversité varie entre chaque étape de maturation du compost (De Gannes *et al.*, 2013; Hansgate *et al.*, 2005; Langarica-Fuentes *et al.*, 2014). Ces bioaérosols représentent également un risque de contamination fongique pour les habitations avoisinant les sites de compost en raison de leur propagation à des distances assez grandes, selon le diamètre aérodynamique de la particule et les conditions météorologiques (Taha *et al.*, 2005; Sánchez-Monedero *et al.*, 2012).

Aussi, les industries transformant les produits forestiers telles que les scieries génèrent des bioaérosols contenant des moisissures (Klaric *et al.*, 2012; Duchaine *et al.*, 2000). Certaines études ont démontré que la concentration de la population fongique dans ces industries est plus élevée que celle des bactéries et que les bioaérosols des scieries sont possiblement des agents potentiellement responsables de problèmes pulmonaires comme l'asthme professionnel et l'alvéolite extrinsèque chez les travailleurs (Park *et al.*, 2010; Monier *et al.*, 2007).

De façon générale, les installations agricoles sont également des environnements propices à la propagation de moisissures dans l'air. Par exemple, on peut décrire les abattoirs de volaille comme un milieu où l'on enregistre un taux élevé de moisissures (Lues *et al.*, 2007; Viegas *et al.*, 2012). Il y a aussi les installations d'élevages bovins et laitiers principalement en raison de la manutention de foin, de paille et de grains dans lesquels on retrouve de grandes quantités de moisissures (Duchaine *et al.*, 1999).

De plus, les usines de transformation alimentaire font aussi face aux problèmes de moisissures dans l'air compte tenu des produits qui y sont transformés. Par exemple, les travailleurs dans la production de fromage, spécialement ceux qui brossent, lavent et emballent le produit final, sont exposés à une grande concentration de moisissures ce qui peut entraîner un risque pour leur santé respiratoire (Simon et Duquenne, 2014). Les entrepôts de fruits et légumes sont un autre exemple d'environnement touché par la présence fongique dans l'air. Étant donné que la grande majorité des maladies végétales sont causées par des moisissures et que ces dernières sont facilement transportées dans l'air, les travailleurs manipulant ces produits ont un risque d'exposition (Sherf, 1987).

Finalement, une grande majorité de travailleurs est employée dans des domaines d'activités non industrielles et non agricoles. Il n'en demeure pas moins que ces travailleurs sont exposés aux bioaérosols fongiques dus à la présence d'humidité dans les bâtiments. En effet, un taux d'humidité excessif permet la croissance de moisissures atypiques dans divers endroits (Samson, 1994). Depuis des années, les professionnels de la santé s'intéressent aux

problèmes d'humidité et de moisissures dans les bâtiments, de même que leurs effets sur la santé des occupants (Fung et Clark, 2004; Lacey et Dutkiewicz, 1994; Douwes *et al.*, 2003).

1.3 Milieu modèle pour l'étude de la biodiversité fongique : traitement des déchets organiques

Environ 1,3 milliard de tonnes de déchets solides sont collectées chaque année dans le monde. Ce chiffre devrait augmenter à 2,2 billions de tonnes d'ici à 2025. L'augmentation provient principalement des pays développés (Hoornweg et Bhada-Tata, 2012). Au Canada, la quantité de déchets (résidentiels et non résidentiels) traités en 2014 était de 25 millions de tonnes. La croissance des déchets produits au Canada suit la tendance de l'augmentation mondiale. Le nombre d'employés au Canada concernés par un environnement de traitements de déchets est passé de 27 261 en 2010 à environ 35 000 en 2014 (Statistique Canada, 2017).

1.3.1 Sites de compostage

Le compostage est un procédé biologique permettant de valoriser les déchets biodégradables. Il représente une des techniques les plus prometteuses sur le plan de la gestion des résidus biologiques pour les prochaines années (Sykes *et al.*, 2007). Le produit final obtenu à la suite du compostage peut être utilisé comme un engrais dont la qualité dépend de celle du compost après la maturation (Fuchs, 2003).

La dégradation de la matière organique se fait préférentiellement sous des conditions aérobies et nécessite la présence de la communauté microbienne à forte concentration (Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, 1998). Plus spécifiquement, la population fongique joue un rôle particulièrement important dans la décomposition de substrats organiques difficilement dégradables en une forme plus utilisable par les bactéries (Hoorman, 2011). La capacité enzymatique des champignons et des moisissures leur permet de dégrader des polymères de plantes complexes (lignine) qui sont difficilement dégradables par les autres microorganismes (Floudas *et al.*, 2012). Ainsi, la possibilité d'utiliser le compost pour améliorer la fertilité des sols dans les milieux agricoles réside dans sa richesse en substance humique qui est déterminée par la présence de bactéries, de champignons et de moisissures (Huber et Schaub, 2011). Les différents rôles joués par les membres des quatre divisions taxonomiques des populations fongiques (*Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* et *Deuteromycota*) dans la formation du compost laissent croire à la présence d'une importante diversité fongique (Hansgate *et al.*, 2005; Hoorman, 2011; De Gannes *et al.*, 2013). De plus, les caractéristiques physico-chimiques du compost soient le pH, la température et le contenu en humidité changent en fonction des différentes phases de compostage, ce qui peut mener à une variation de la communauté fongique d'une phase à l'autre (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014). Plus particulièrement, le carbone soluble dans l'eau (WSC), la température et la teneur en humidité sont responsables des variations spatiotemporelles affectant la communauté fongique du compost (Zhang *et al.*, 2011).

En raison de leurs structures constituées d'hyphes, de spores et de corps fructifères, les membres des populations fongiques ont tendance à se propager plus facilement dans l'environnement sous l'effet du mouvement de l'air ou des variations de différents facteurs environnementaux, dont un particulièrement important soit l'humidité relative. Les moisissures constituent donc une des composantes les plus importantes des bioaérosols (Kakde, 2012).

Les bioaérosols sont générés durant le processus de compostage et le type de matière organique composté en affecte le contenu (Epstein, 1996). Ainsi, quelle que soit la procédure de compostage utilisée (réactive ou non réactive), le compost subit plusieurs actions de broyage, de brassage et d'aération forcée (Haug, 1993). Ces agitations, en plus du déchargement des déchets (de la matière première) à composter, peuvent mener à la libération de bioaérosols dans l'air. D'ailleurs, il a été noté que les quantités les plus importantes de bioaérosols sont générées durant ces activités (Sánchez-Monedero *et al.*, 2012; Taha *et al.*, 2005; Persoons *et al.*, 2010).

1.3.2 Usines de biométhanisation

La biométhanisation est une activité associée au compostage puisqu'elle se définit comme étant le processus par lequel la matière organique est convertie en biogaz à l'aide d'une activité microbienne (Angelidaki *et al.*, 2011). Cette méthode a un fort potentiel de production d'énergie à partir de déchets organiques. C'est la raison pour laquelle de plus en plus d'usines de biométhanisation voient le jour à travers le monde. Récemment, le ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques de la province de Québec a émis un programme de traitement des matières organiques par biométhanisation et compostage qui a permis la construction des premières usines de biométhanisation sur son territoire. Toutefois, les risques liés à l'exposition des travailleurs aux bioaérosols émis par les activités de biométhanisation ne sont pas encore connus. Étant donné le rôle particulier des moisissures dans la dégradation de la matière organique, il se pourrait qu'elles se retrouvent dans l'air des usines représentant ainsi un risque d'exposition pour les travailleurs. Celle-ci peut survenir lors des activités de biométhanisation à l'air libre incluant la réception, l'entreposage et le prétraitement des matières organiques (Searl et Crawford 2012), ainsi que lors de la manipulation du digestat (vidange du digesteur, entreposage, brassage du compost) (ADEME, 2009; Nadal *et al.*, 2009).

1.4 Lacunes dans l'étude de la biodiversité fongique des bioaérosols

La majorité des études ayant caractérisé la biodiversité fongique des bioaérosols se sont basées sur les méthodes de culture. Sachant que seulement 1 % des moisissures est cultivables à partir d'échantillons d'air (Peccia et Hernandez, 2006), cela crée un important biais dans la représentation de la communauté des moisissures, et ce, tant au niveau qualitatif que quantitatif. De plus, puisque les taux de récupération peuvent se révéler inacceptables et que les milieux de culture favorisent certaines espèces au détriment d'autres, cela peut occulter la présence de certaines espèces d'intérêt. Ce dernier aspect est l'une des raisons de l'absence de consensus sur les marqueurs microbiens mettant en lien l'exposition aux moisissures et les effets sur la santé. Effectivement, la nocivité des bioaérosols fongiques dépend de la composition des espèces, de la synergie entre ces dernières ainsi que des conditions de croissance des moisissures (Garett *et al.*, 1998; Tuomi *et al.*, 2000; Huttunen *et al.*, 2004). Même les méthodes de biologie moléculaire nécessitant des approches de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) ne permettent pas d'étudier quantitativement la diversité fongique de l'air. Il n'est donc pas surprenant qu'il n'y ait ni méthode universelle ni consensus permettant d'explorer de manière précise l'association entre les bioaérosols, l'exposition aux moisissures et les effets sur la santé.

1.5 Séquençage nouvelle génération et diversité fongique

Le séquençage d'ADN de nouvelle génération (SNG) représente une opportunité en matière d'analyse quantitative de la diversité fongique de l'air d'environnements intérieurs. En effet, l'obtention de dizaines de milliers de séquences d'ADN par échantillon d'air favorise une analyse approfondie de la diversité fongique. Ainsi, les espèces sous-estimées ou non représentées par les méthodes d'analyse par culture peuvent être mises en évidence et éventuellement associées à des effets sur la santé humaine. L'utilisation des séquences d'ADN pour identifier les moisissures se heurte au problème de la région du génome à utiliser, car, pour étudier la diversité fongique d'un échantillon, il est nécessaire de choisir un segment standardisé du génome, appelé code-barres, afin de dresser un profil fongique complet de chaque échantillon. Les différentes séquences proposées comme codes-barres fongiques et étudiées par la communauté scientifique depuis plusieurs années présentent chacune des avantages et des inconvénients (Seifert, 2009).

L'espace interne transcrit (ITS) est une région située sur l'ADN génomique des eucaryotes entre les gènes codant pour l'ARNr 28S et 18S. Elle est composée de trois sous-régions : l'ITS1, l'ITS2 et le gène 5.8S. Ainsi, l'évolution rapide de cette région permet d'obtenir une identité taxonomique spécifique (O'Brien *et al.*, 2005). En effet, la variabilité de l'ITS semble favoriser l'identification du genre et de l'espèce des populations fongiques (Schoch *et al.*, 2012). De plus, son utilisation depuis plusieurs années dans l'identification des moisissures a permis de générer plus de deux cent mille séquences ITS fongiques disponibles publiquement (Karsh-Mizrachi *et al.*, 2011). L'emploi de la région ITS pour l'étude de la diversité fongique s'avère prometteuse puisqu'elle permet d'identifier des espèces fongiques rarement détectées auparavant (Rittenour *et al.*, 2014). Toutefois, dans certains cas, l'ITS fongique est sujet à une variabilité intraespèce qui peut introduire un biais dans l'identification des moisissures (Nilsson *et al.*, 2006; Blaali *et al.*, 2013).

Ainsi, pour répondre aux lacunes actuelles sur le plan de la caractérisation de la diversité fongique dans les environnements à risque, une approche par SNG adaptée pour l'étude des moisissures dans l'air représente une avenue essentielle à explorer. De ce fait, un environnement qui montre une variation de la diversité fongique dans l'espace et dans le temps représente un bon moyen pour mettre au point une telle approche d'étude des bioaérosols fongiques et apporter des informations supplémentaires sur l'utilisation de la région ITS comme marqueurs fongiques. De plus, l'opportunité de pouvoir valider la méthode développée dans un environnement pilote est un atout majeur pour son application dans de futurs environnements à risque.

1.6 Environnement pilote pour la comparaison des méthodes d'étude de la diversité fongique des bioaérosols : fermes laitières

En 2013, le Canada comptait 12 234 fermes laitières employant environ 215 000 travailleurs avec un PIB de l'industrie laitière de 18,9 milliards de dollars comparativement à 15,3 milliards de dollars en 2009 (Dairy Farmers of Canada, 2015). Les fermes laitières ont été associées à de fortes concentrations de moisissures principalement en raison de la manutention de foin, de paille et de grains dans lesquels on retrouve de grandes quantités de moisissures (Duchaine *et al.*, 1999). Plusieurs études mentionnent les problèmes respiratoires au sein des travailleurs de l'industrie laitière, les plus cités étant l'asthme, la maladie chronique obstructive, les pneumopathies d'hypersensibilité (poumon du fermier), la bronchite chronique et le cancer (Reynolds *et al.*, 2013). Le type d'alimentation du bétail est une source de la variabilité des bioaérosols fongiques dans les fermes laitières. Il peut s'agir de fourrage, de foin ou encore

d'ensilage de maïs. D'autres facteurs tels que le type de bâtiment, la façon de faire la traite et le nombre d'animaux représentent des sources importantes de variation des bioaérosols fongiques. L'échantillonnage de l'air de différentes fermes laitières serait un bon moyen de valider l'efficacité des méthodes d'étude de la diversité fongique des bioaérosols et ainsi saisir les variations des communautés fongiques selon les conditions présentes dans les différentes fermes.

2. ÉTAT DES CONNAISSANCES

La culture demeure le procédé usuel utilisé depuis plusieurs décennies pour l'évaluation de l'exposition aux moisissures et la plupart des connaissances relatives à leur présence sont issues de ces méthodes dites classiques (Pitkäranta *et al.*, 2008). Comme mentionné ci-haut, cela résulte en un biais important dans la représentation de la communauté des moisissures, et ce, tant au niveau qualitatif que quantitatif (Hawksworth, 1991).

L'utilisation des méthodes de biologie moléculaire dans un environnement comme les fermes laitières a permis d'identifier pour la première fois des archées ayant un potentiel immunogène qui pourraient être responsables de problèmes respiratoires pour les travailleurs qui y sont exposés (Blais Lecours *et al.*, 2012). Toutefois, la diversité des moisissures dans l'air a rarement été caractérisée par des méthodes moléculaires.

À cet effet, une étude récente sur le compostage en France a utilisé la région de l'ADNr 18S pour la diversité des bioaérosols émis à partir des sites de compostage. Les résultats obtenus montrent une faible diversité fongique comparativement aux bactéries étudiées à l'aide de l'ADNr 16S (Le Goff *et al.*, 2010).

Schoch et ses collaborateurs ont démontré en 2012 que la région ITS permet la meilleure identification du genre et de l'espèce des moisissures, dans un consortium de moisissures comparativement aux autres régions testées (Schoch *et al.*, 2012). Par conséquent, l'ITS a été proposé au Consortium for the Barcode of Life comme marqueur fongique universel avec la possibilité de développer d'autres marqueurs pour des groupes taxonomiques en particulier.

En raison de la limitation de la taille des amplicons utilisés dans la majorité des séquenceurs de nouvelle génération (ex. : HiSeq, MiSeq, Ion torrent), seulement l'ITS1 ou l'ITS2 sont utilisés comme marqueurs fongiques dans les échantillons, à défaut de pouvoir utiliser la totalité de la région ITS. Aucune étude ne s'est encore attardée à comparer les deux régions (ITS1 et ITS2) dans la description complète des moisissures présentes dans un échantillon d'air dans le cadre des études d'exposition des travailleurs.

3. OBJECTIFS DE RECHERCHE

Objectif 1

Adapter les méthodes de profilage par SNG à l'étude de la biodiversité fongique de l'air en utilisant des échantillons d'ADN provenant de différents types de compost¹ et de deux centres de biométhanisation².

Sous-objectifs

- a) Déterminer quelle région de l'ADN (ITS1 ou ITS2) permet le meilleur profil de biodiversité avec les échantillons provenant des différents types de compost;
- b) Optimiser le rendement de la méthode d'extraction de l'ADN fongique et son applicabilité à des échantillons d'air provenant d'usines de biométhanisation;
- c) Appliquer la procédure SNG développée au sous-objectif 1(a) aux échantillons d'air provenant d'usines de biométhanisation.

Objectif 2

Réaliser une étude pilote dans un environnement (fermes laitières) où l'on retrouve des moisissures diverses afin de comparer les comptes, les identifications et les indices de richesse obtenus à l'aide des méthodes classiques et de la technique de SNG nouvellement développée.

¹ Échantillons provenant de l'étude IRSST # [2012-0029](#)

² Échantillons provenant de l'étude IRSST # [2013-0013](#) .

4. MÉTHODOLOGIE

4.1 Échantillonnage-terrain

4.1.1 Sites de compostage

Les échantillons utilisés proviennent d'une étude portant sur le suivi de la maturation du compost financée par l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) (# [2012-0029](#)). Les deux sites de compostage visités traitent des déchets différents, soient des matières domestiques issues de la collecte sélective résidentielle et des carcasses et placentas provenant d'une ferme d'élevage de porcs. Le compostage domestique a duré 6 semaines et celui des carcasses de porc 24 semaines. Les sites de compostage domestique ont été visités à deux reprises au printemps et à deux reprises durant l'été, alors que les sites de compostage des carcasses de porc ont été visités une fois en été et une fois à l'automne.

À chaque visite, trois échantillons d'air ont été prélevés au début, au milieu et à la fin du quart de travail. De plus, deux échantillons contrôle ont été récoltés : un contrôle sans activité pour déterminer la composition initiale des bioaérosols et un contrôle à l'extérieur des sites de compostage. De plus, des échantillons de compost ont été collectés au même moment que les échantillons d'air afin de comparer le contenu des bioaérosols avec la source. Chaque échantillon de compost correspond à un litre de matière organique récolté dans le tas de compost ou dans la pelle mécanique durant les étapes de brassage. Après homogénéisation par agitation manuelle, un sous-échantillon de 25 g a été homogénéisé une seconde fois avec 200 ml de tampon de phosphate salin contenant 0,05 % de Tween 20 en utilisant un filtre stomacher stérile (Labplas, Québec, Canada) dans un stomacher Mix 1 (Aes Laboratoire, Bruz, France).

4.1.2 Usines de biométhanisation

Deux usines de biométhanisation ont été visitées dans le cadre d'un projet financé par l'IRSST (# [2013-0013](#)). Les deux usines visitées traitent différentes sortes de matières organiques sous différentes conditions. La première usine traite des boues primaires et secondaires d'usine de traitement des eaux usées et des déchets organiques de l'industrie alimentaire sous des conditions mésophiles. L'usine a une capacité de traitement de 40 000 tonnes de déchets annuels. La deuxième usine valorise des déchets domestiques sous des conditions thermophiles avec une capacité annuelle de traitement de 27 000 tonnes de déchets.

Dans la première usine, les échantillons d'air ont été prélevés à cinq endroits : 1) la réception, 2) le traitement, 3) l'entreposage et la maturation de la matière organique sèche, 4) les presse-filtres pour la séparation du liquide de la matière solide, 5) l'entreposage du produit final où le digestat sec est mis dans des camions pour une maturation additionnelle. Dans la seconde usine, les deux sites échantillonnés étaient 1) la réception qui incluait une étape de broyage, 2) le site de mélange de la matière organique avec un tampon avant la mise dans le digesteur.

4.1.3 Fermes laitières

Des échantillons ont été prélevés dans cinq fermes laitières durant l'été. Dans chacune d'elles, le site d'échantillonnage était choisi selon les endroits dans lesquels les activités génèrent le plus de bioaérosols. Les caractéristiques des cinq fermes laitières différaient au regard du type de bâtiment (âge, volume, ventilation), de nombre de têtes (vaches), de type de traite

(automatique ou manuelle) et de type d'alimentation du bétail. Pour chaque ferme, trois échantillons d'air ont été récoltés la même journée pour un total de 15.

4.2 Échantillonneur d'air

Dans les trois environnements, l'échantillonnage de l'air a été effectué à l'aide de l'appareil Coriolis μ (Bertin Technologies, France) à un débit de 200 l/min pendant 10 minutes. Ce débit d'air permet de créer un vortex grâce auquel les particules d'air rentrent dans le récipient du Coriolis et impactent dans le liquide. Quinze millilitres d'une solution tampon saline de phosphate stérile à une concentration de 50 mM avec un pH de 7,4 ont été utilisés pour remplir le récipient d'échantillonnage du Coriolis. Celui-ci a un diamètre aérodynamique (d50) médian de 0,5 μm pour un débit de 300 l/min. Ainsi, les particules d'une taille de 0,5 μm sont échantillonnées à 50 % d'efficacité et les grandes particules sont échantillonnées avec une plus grande efficacité. Dans les environnements agricoles et de traitements des déchets, la taille des particules portant les microorganismes est relativement grande (entre 2 et 10 μm). Au débit utilisé, l'échantillonneur était à sa meilleure efficacité d'échantillonnage en ce qui concerne la taille des particules récupérées dans les environnements échantillonnés. À cause de l'évaporation d'une partie du liquide d'échantillonnage, la solution de récolte est complétée avec une solution de Tween20 à 0,1%. L'utilisation du détergent Tween20 permet de rendre les microorganismes hydrophobes plus facilement récupérables à partir du liquide d'échantillonnage. Selon le taux d'humidité présent lors de l'échantillonnage, le volume évaporé varie entre 2 et 7 ml.

4.3 Diversité fongique par méthode de culture

À partir des 15 ml récoltés par le Coriolis, 1 ml a été utilisé pour faire des dilutions sérieées allant de 10^0 à 10^{-4} . Les dilutions ont été réalisées en triplicata à l'aide d'une solution saline contenant du Tween 20. Cent microlitres de chaque dilution ont été étalés sur le milieu rose-bengal avec du chloramphénicol à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. Ce milieu a été choisi pour sa capacité à réduire la taille de la croissance des colonies et ainsi éviter l'obtention de pétris contenant des croissances confluentes. Ce type de croissance empêche l'isolement des différentes colonies pour l'étude de la diversité fongique. La concentration de l'antibiotique chloramphénicol a été déterminée comme étant celle avec le résultat le plus optimal. La moitié des pétris ont été incubés à 25 °C pour la croissance des moisissures mésophiles et l'autre moitié à 50 °C pour la croissance des moisissures thermophiles. Après cinq jours d'incubation, les moisissures obtenues par culture ont été dénombrées, isolées et identifiées.

4.4 Identification des moisissures isolées par culture

Les spores des cultures pures de moisissures ont été recueillies avec 1 ml d'une solution saline 0,9 % et de Tween 20 0,1 %. Par la suite, 200 μl de cette solution ont été déposés sur une carte FTA (Sample Collection Cards). La zone inoculée de la carte FTA a été poinçonnée à cinq reprises et les poinçons ont été placés dans un microtube. Par la suite, les poinçons ont été lavés à trois reprises avec un agent de purification FTA et, par la suite, avec de l'IDTE à pH 8. Ce lavage a pour objectif d'éliminer les substrats chimiques présents dans les cartes FTA pouvant altérer la réaction d'amplification de l'ADN. Quarante-huit μl de la solution Master-mix (Tableau 1, annexe A) ont été ajoutés à chacun des microtubes, avant l'amplification de la région ITS fongique des échantillons et le séquençage. Ce protocole, décrit par White et ses collaborateurs (1990), a été réalisé au Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL). Les séquences d'oligonucléotides utilisées pour l'amplification de la région ITS sont les suivantes :

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

L'identification des moisissures a été réalisée en comparant les séquences obtenues à celle de la base de données UNITE. Cette base de données a connu une prolifération de séquences environnementales fongiques depuis la démocratisation des techniques SNG. Elle contient des séquences ITS fongiques de qualité, adaptées pour ce projet.

4.5 Optimisation de la méthode d'extraction de l'ADN fongique

4.5.1 Consortium microbien pour l'évaluation de différentes conditions de concentration des spores fongiques

Un consortium microbien constitué de 3 moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*) et d'une bactérie (*Bacillus*) a été formé dans le but d'optimiser l'efficacité de la méthodologie d'extraction de l'ADN des moisissures. Deux approches différentes de concentration de spores fongiques furent explorées sous différentes conditions. La première approche, qui est la centrifugation, est le procédé utilisé lors du traitement des échantillons d'air récoltés dans un médium liquide. La seconde, qui est une approche basée sur la filtration, a été développée spécifiquement dans le cadre de ce projet. De plus, l'effet de l'utilisation d'un détergent, le Tween 20, a également été évalué lors de l'application des deux méthodes sur le consortium microbien.

À partir de culture pure, les spores des moisissures ont été récoltées à l'aide d'une solution tampon de phosphate avec ou sans Tween 20 (0,1 %). Des colonies pures de *Bacillus* ont également servi d'inoculum pour les solutions tampons. Avant de former le consortium, la concentration (cellule/ml) de chacune des solutions contenant les microorganismes a été calculée en microscopie à l'aide d'un hématimètre. Le but de cette étape est de former un consortium contenant la même proportion de microorganismes. Le volume final du consortium était de 15 ml.

4.5.2 Protocole de centrifugation standard

Une aliquote de 1,5 ml de la solution de consortium (avec et sans Tween 20) a été placée dans un tube Eppendorf (1,5 ml) qui a été centrifugé à une vitesse de 14,000 x g pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot conservé à -20 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

4.5.3 Protocole de filtration nouvellement développé

Une aliquote de 10 ml de la solution de consortium (avec et sans Tween) a été filtrée à travers une membrane en polycarbonate de 25 mm avec une taille de pores de 0,2 µm en utilisant une unité de filtration sous vide. Les filtres ont été placés dans un tube Eppendorf (1,5 ml) avec 750 µl de la solution de tampon d'extraction (bead solution) du kit d'extraction d'ADN Mo Bio PowerLyser® PowerSoil® (Carlsbad, CA, États-Unis). Une bille en tungstène d'un diamètre de 0,3 cm a été insérée également dans le tube Eppendorf. Les filtres ont été congelés rapidement en mettant le tube Eppendorf dans un bain de glace sèche avec de l'éthanol à 99 %. Par la suite, les filtres ont été pulvérisés grâce à la bille en tungstène, en plaçant l'Eppendorf dans un homogénéisateur (Mixer Mill MM 301, Retsch, Düsseldorf, Germany) à une fréquence de 20 mouvements par seconde, pendant 20 minutes. Le liquide résultant contenant les particules de

filtres pulvérisées a été utilisé comme aliquote pour la première étape du kit d'extraction de l'ADN.

4.5.4 Application de la méthode sur les échantillons d'air des usines de biométhanisation

Les mêmes protocoles (centrifugation et filtration) décrits ci-haut ont été appliqués aux échantillons d'air prélevés à l'aide du Coriolis dans les usines de biométhanisation. Les aliquotes utilisées pour les deux méthodes provenaient du liquide de récupération du Coriolis. Après l'échantillonnage, le volume du liquide dans le récipient du Coriolis a été ajusté à 15 ml en complétant avec une solution de Tween 20 à 0,1 %.

4.5.5 Extraction de l'ADN

Le kit d'extraction Mo Bio PowerLyser® PowerSoil® Isolation DNA kit (Carlsbad, CA, États-Unis) a été utilisé pour extraire l'ADN génomique total en suivant les instructions du fabricant. Après l'élution, l'ADN a été conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation subséquente.

4.5.6 Quantification PCR en temps réel

L'amplification de l'ADN a été réalisée avec l'appareil Bio-Rad CFX96 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Canada). La recette PCR contenait 2 µl d'ADN, 0,150 µmol/litre pour chaque amorce, 0,150 µmol/litre pour la sonde et 7,5 µl du master mix 2× QuantiTect (QuantiTect Probe PCR kit; Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) pour un total de 15 µl par réaction. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Bio-Rad CFX Manager version 3.0.1224.1015 (Bio-Rad Laboratories). Le tableau 2 (annexe B) illustre les amorces, la sonde et le protocole d'amplification utilisés dans le cadre de ce projet.

4.6 Séquençage de nouvelle génération (MiSeq Illumina)

L'amplification du gène codant pour la région ITS, le regroupement équimolaire et le séquençage ont été réalisés à la plateforme d'analyses génomiques (Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, Canada). Brièvement, l'amplification de la région ITS a été faite en utilisant les séquences spécifiques décrites par Tedersoo et ses collaborateurs (2015). L'approche utilisée est une PCR double-index (dual-indexed) à deux étapes, spécifiquement développée pour les instruments d'Illumina. Tout d'abord, la séquence du gène a été fusionnée aux amorces de séquençage TruSeq d'Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, États-Unis) et la PCR a été effectuée dans un volume total de 25 µl contenant 1X Q5 de tampon (NEB), 0,25 µM de chaque amorce, 200 µM de chaque dNTP, 1 U de Q5 de la polymérase High-Fidelity DNA (NEB) et 1 µl d'extrait d'ADNc. Le protocole PCR commence avec une dénaturation initiale à 98 °C pendant 30 s, suivie d'une dénaturation de 35 cycles à 98 °C pendant 10 s, un appariement à 55 °C pendant 10 s, une élongation à 72 °C pendant 30 s et une extension finale à 72 °C pendant 2 min. La réaction PCR a été purifiée en utilisant le kit de nettoyage Axygen. La qualité du produit PCR purifié a été évaluée sur un gel d'agarose 1 %. Une dilution de 50 à 100 fois du produit PCR purifié a été utilisée comme échantillon d'ADN pour la seconde réaction PCR, dans le but d'ajouter les codes-barres (dual-indexed) et les séquences manquantes requises pour le séquençage Illumina. Les cycles PCR de la deuxième réaction étaient identiques à ceux de la première réaction PCR, mais avec seulement 12 cycles. La réaction PCR a été purifiée comme

mentionné ci-haut, la qualité a été validée à l'aide de la puce DNA 7500 Bioanalyzer (Agilent) et quantifiée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Les amplicons contenant les codes-barres ont été regroupés en une concentration équimolaire pour le séquençage à l'aide de la plateforme MiSeq d'Illumina.

Les séquences d'oligonucléotides utilisées pour l'amplification des séquences d'ITS1 et d'ITS2 sont les suivantes :

Région ITS1

ITS1Fngs: ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

ITS2: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGCGTTCTTCATCGATGC

Région ITS2

ITS3tagmix1:

ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCAG

ITS3tagmix2:

ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGACTCGTCAACGATGAAGAACGCAG

ITS3tagmix3:

ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGACTCGTCACCGATGAAGAACGCAG

ITS3tagmix4:

ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGTAG

ITS3tagmix5:

ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGTGG

ITS4ngs: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCCTSCGCTTATTGATATGC

Generic forward second-PCR primer

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[index1]ACACTCTTTCCCTACACGAC

Generic reverse second-PCR primer

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[index2]GTGACTGGAGTTCAGACGTGT.

Il est à noter que les amorces utilisées dans ce projet contiennent des séquences spécifiques d'Illumina, protégées par la propriété intellectuelle³.

4.7 Protocole bio-informatique pour le traitement des séquences

Les millions de séquences générées à la suite du séquençage ont été traitées et analysées à l'aide d'un protocole bio-informatique développé de façon personnalisée, utilisant les outils d'écologie microbienne tels que Mothur, USEARCH et QIIME. La méthode d'analyse bio-informatique est expliquée dans l'article décrivant l'exposition aux bioaérosols fongiques dans les sites de compostage (Mbareche *et al.*, 2017). Brièvement, les séquences générées en paires « paired-end » ont été combinées en utilisant Mothur V1.35.1 (Schloss *et al.*, 2009). Une étape de filtration a été réalisée à l'aide de Mothur également afin d'éliminer les séquences ambiguës et de mauvaise qualité. En utilisant USEARCH V7.0.1090, les séquences similaires ont été regroupées afin de réduire la lourdeur des ressources informatiques. Toutefois, le nombre de copies des mêmes séquences a été noté pour les futures étapes. Le programme ITSx (Mistry *et al.*, 2013) a permis l'extraction des régions ITS d'origine fongique dans les

³ Oligonucleotide sequences © 2007-2013 Illumina, Inc. All rights reserved. Derivative works created by Illumina customers are authorized for use with Illumina instruments and products only. All other uses are strictly prohibited.

séquences. L'algorithme HMMER3 compare les séquences traitées à un jeu de données modèle contenant des séquences ITS de différents organismes. Seules les séquences appartenant aux moisissures ont été conservées pour les étapes subséquentes. Les séquences montrant une similarité d'au moins 97 % ont été regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (UTO) à l'aide du programme UPARSE V7.1 (Edgar, 2013). Les séquences chimériques ont été identifiées et éliminées à l'aide de UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). L'assignation d'une identité taxonomique aux UTO est basée sur la banque de données UNITE contenant les séquences références d'ITS. Cette étape ainsi que la génération du tableau des UTO ont été réalisées à l'aide de QIIME V1.9.0. (Caporaso *et al.*, 2010)

Tous les résultats de l'analyse d'écologie microbienne ont été effectués à l'aide des scripts de QIIME. Dans l'analyse des profils taxonomiques, le pourcentage d'abondance relative de chaque taxon représente la moyenne de l'abondance obtenue dans chacun des sites échantillonnés. Dans les sites de compostage, la variable utilisée pour comparer le contenu fongique des échantillons est le type de déchets traités dans chacun des sites visités (animal et domestique). Pour les usines de biométhanisation, les profils d'abondance relative ont été comparés selon l'usine visitée. Chaque usine traite un type de déchets différent. De plus, les profils ont été comparés également selon la saison de récolte (été et hiver). Finalement, les profils taxonomiques des fermes laitières représentent la différence entre les 5 fermes visitées. Dans des résultats non publiés, il a été démontré que les profils taxonomiques n'ont pas une grande variation de biodiversité fongique entre chaque échantillon prélevé dans un même site.

5. RÉSULTATS

5.1 Comparaison des régions ITS1 et ITS2 dans les échantillons de compost

5.1.1 Diversité alpha (*indice de richesse et de diversité*)

La diversité alpha est définie comme une estimation de la diversité à l'intérieur d'une communauté. C'est la richesse en espèces au sein d'un échantillon. Il existe différents moyens de mesurer la diversité alpha. Les plus communément utilisés sont : Chao1, Simpson, Shannon et le nombre d'UTO observées.

Des indices de richesse et de diversité ont été utilisés pour comparer les résultats obtenus à la suite du séquençage de l'ITS1 et de l'ITS2 dans les échantillons de compost. Plus spécifiquement, l'estimateur de richesse Chao1 et les indices de diversité Shannon et Simpson sont les outils de mesure de la diversité alpha utilisés. Plus un échantillon contient des UTO différentes, plus l'indice de Chao1 estime une grande richesse d'espèces et donne une valeur de l'indice élevée. En ce qui a trait aux indices de Shannon et de Simpson, la richesse des espèces est combinée à l'abondance relative pour donner une seule mesure de la diversité. L'indice de Simpson représente la probabilité que deux UTO sélectionnées aléatoirement dans un échantillon appartiennent à la même espèce. Les valeurs de cet indice varient entre 0 et 1. Plus l'échantillon contient une grande diversité, plus sa valeur se rapproche de 1 et vice versa. En revanche, les valeurs de l'indice de Shannon sont généralement comprises entre 0 et 5.

La figure 1 montre les résultats obtenus à la suite de la comparaison des mesures de diversité entre l'ITS1 et l'ITS2. Il est possible de voir que les valeurs sont plus élevées lorsque l'ITS1 est ciblé, et ce, pour les trois indices de mesures. Même si pour l'indice de Shannon, l'ITS1 et l'ITS2 montrent approximativement la même valeur minimale, la médiane et la valeur maximale sont plus élevées pour l'ITS1. En revanche, pour l'estimateur de richesse Chao1 et l'indice de diversité Simpson, les valeurs maximums de l'ITS2 représentent approximativement les valeurs minimums obtenues par l'ITS1.

Plus spécifiquement, la performance des régions ITS1 et ITS2 dans la mesure de la diversité a été comparée dans chacun des deux types de sites de compostage visités. Les figures 2 et 3 représentent les résultats obtenus pour les trois mesures de diversité des échantillons de compost domestique et animal, respectivement. Comme observé pour la figure 1, chacune des mesures est plus élevée lors de l'utilisation de la région ITS1 par rapport à la région ITS2. En effet, même si dans certains cas l'écart-type est élevé dans les échantillons l'ITS1 (Chao1-domestique (186 ± 230), Chao1-animal (190 ± 169) et Shannon-domestique ($4,95 \pm 3,1$), Shannon-animal ($4,82 \pm 3,13$)), les valeurs médianes et les valeurs maximales restent plus importantes comparativement aux valeurs obtenues lors de l'utilisation de la région ITS2.

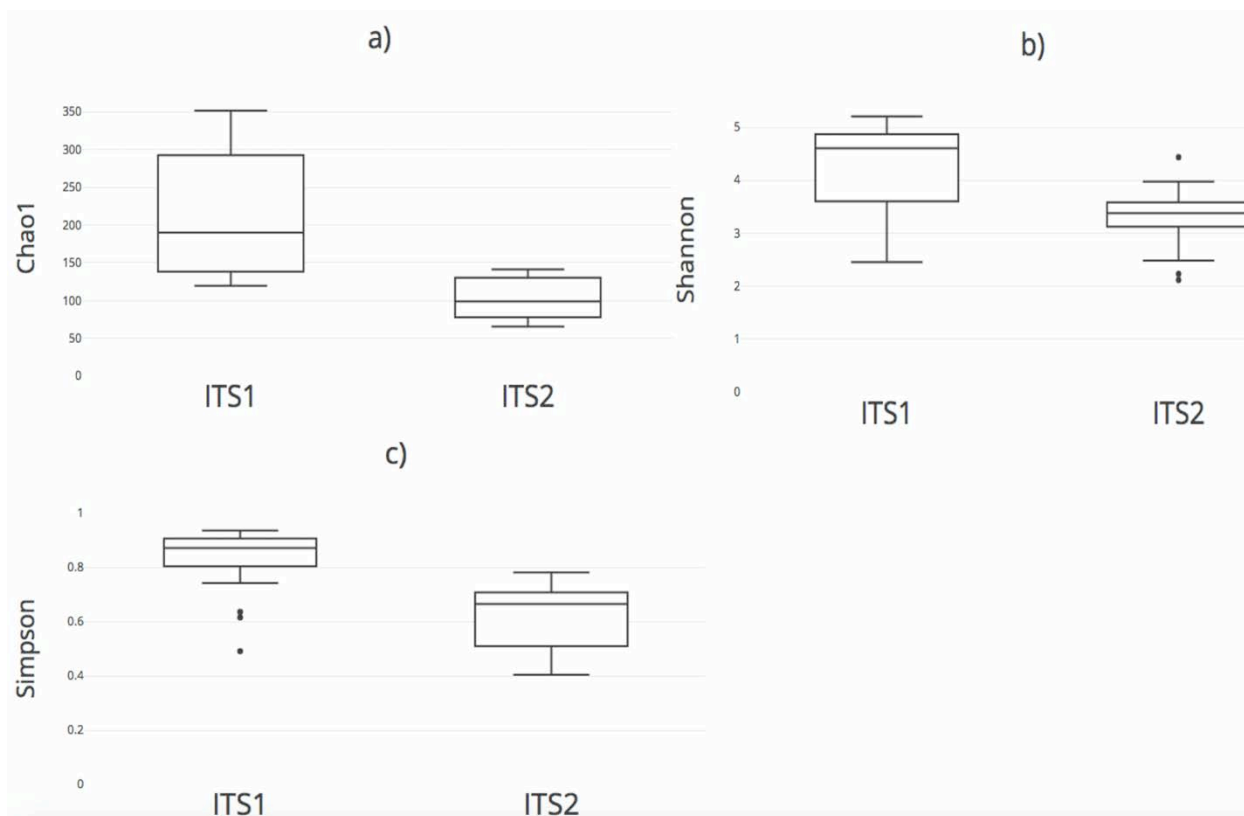


Figure 1 : Comparaison des indices de diversité α obtenus par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 des échantillons provenant des sites de compostage (animal et domestique).

L'estimateur de richesse Chao1 (a) et les indices de diversité Shannon (b) et Simpson (c) montrent des valeurs plus élevées lorsque la région ITS1 est ciblée par les méthodes de séquençage comparativement à la région ITS2.

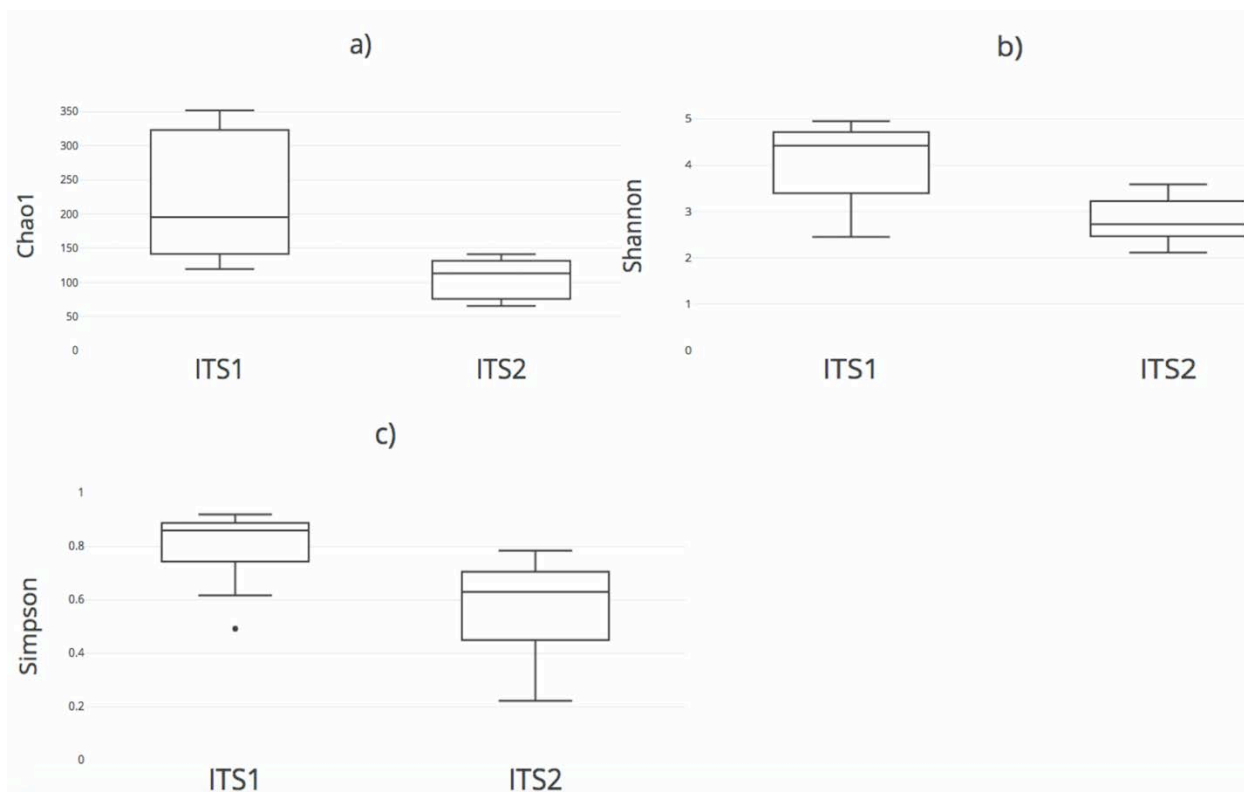


Figure 2 : Comparaison des indices de diversité α obtenus par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 provenant du compost domestique.

L'estimateur de richesse Chao1 (a) et les indices de diversité Shannon (b) et Simpson (c) montrent des valeurs plus élevées lorsque la région ITS1 est ciblée par les méthodes de séquençage comparativement à la région ITS2.

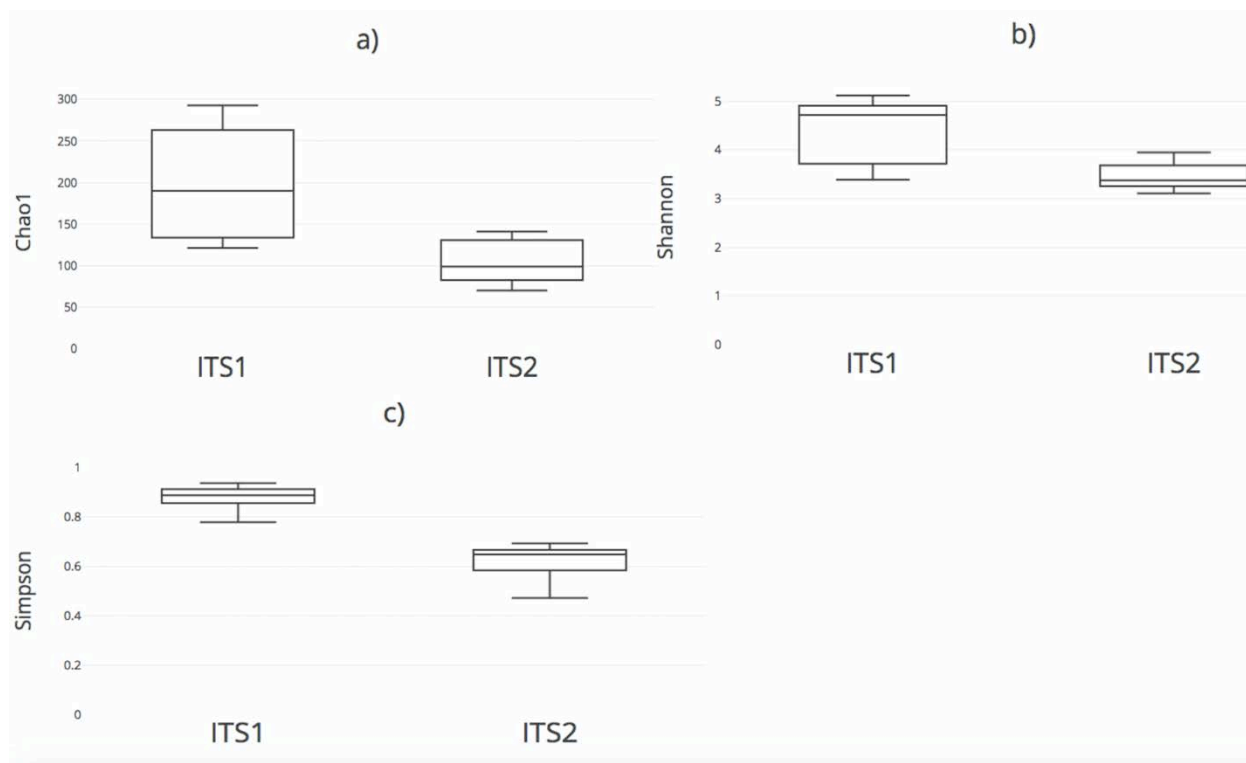


Figure 3 : Comparaison des indices de diversité α obtenus par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 provenant du compost animal.

L'estimateur de richesse Chao1 (a) et les indices de diversité Shannon (b) et Simpson (c) montrent des valeurs plus élevées lorsque la région ITS1 est ciblée par les méthodes de séquençage comparativement à la région ITS2.

5.1.2 Analyse taxonomique

Afin de valider les résultats obtenus à la suite de l'analyse de la diversité alpha comparant les régions ITS1 et ITS2, une identification taxonomique des UTO a été réalisée. La figure 4 illustre l'abondance relative des classes de moisissures obtenues par l'ITS1 et l'ITS2. Dans certains cas, l'identification a été effectuée jusqu'au rang taxonomique du phylum uniquement (Ascomycota, Basidiomycota et Zygomycota). Lorsque l'identification des UTO n'a pu être effectuée, les séquences ont été regroupées sous la légende Fungi. En revanche, la légende *No blast* sous-entend qu'il ne s'agit pas de séquence fongique. Il est possible de voir que la région de l'ITS1 a permis l'obtention d'un meilleur profil fongique comparativement à la région ITS2. En effet, une meilleure répartition des différentes classes de moisissures est observée lors de l'utilisation d'ITS1. Avec l'ITS2, une seule classe, celle des Saccharomycota, semble dominer. De plus, le phylum des Zygomycota et la classe des Exobasidiomycota n'ont pas été détectés dans la région ITS2. Plus encore, 4,1 % des séquences ITS2 n'ont été identifiées à aucune des séquences fongiques (*No blast*). Par contre, les séquences ITS1 ont toutes été identifiées comme fongiques.

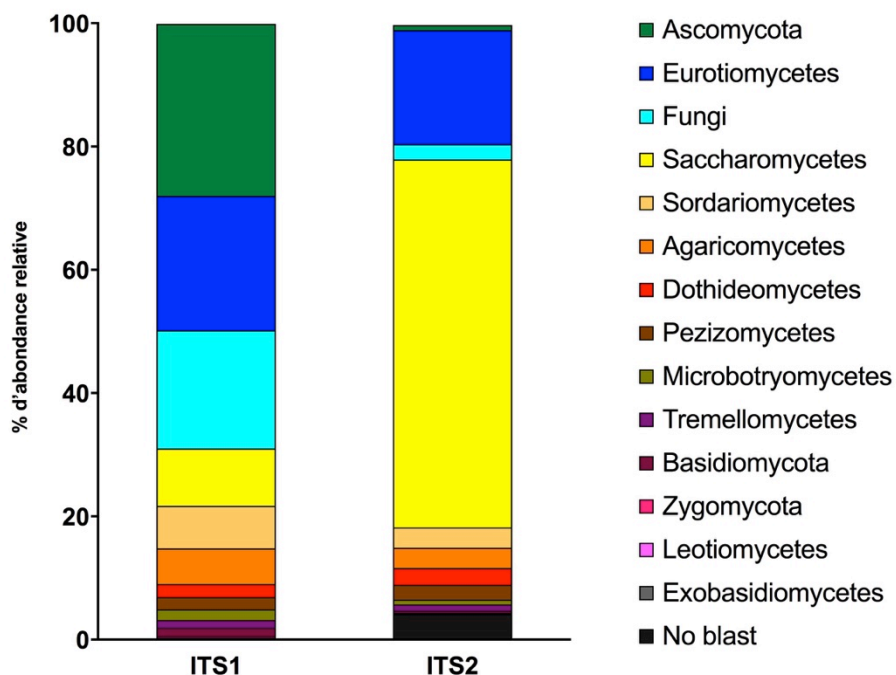


Figure 4 : Abondance relative des classes de moisissures obtenues par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 des échantillons provenant des sites de compostage (animal et domestique).

Le profil fongique est plus diversifié et mieux réparti lors de l'utilisation de la région ITS1. Des séquences non identifiées (No blast) ont été détectées dans la région ITS2 uniquement. Les pourcentages d'abondance relative montrent que le phylum des Zygomycota et la classe des Exobasidiomycetes n'ont été révélés que dans l'ITS1. La classe des Saccharomycetes occupe plus de 70 % du profil taxonomique obtenu par l'ITS2.

Les observations de l'analyse taxonomique comparant l'ITS1 et l'ITS2 ont été confirmées même lorsque les échantillons ont été séparés selon le type de compost. Les résultats de cette comparaison sont exposés dans les figures 5 et 6 représentant les profils de diversité obtenus par l'ITS1 et l'ITS2 dans les sites de composts domestique et animal, respectivement. Il est facile d'observer que pour les deux types de compost, l'ITS1 donne un meilleur profil de diversité, caractérisé par une bonne répartition des différentes classes de moisissures. Pour l'ITS2, la classe des Saccharomycetales occupe entre 60 % (compost animal) et 70 % (compost domestique) des profils taxonomiques. Aussi, comme décrits dans la figure 4, les Zygomycota et les Exobasidiomycetes ont été identifiées uniquement par l'ITS1 dans les deux types de compost. De plus, la comparaison des profils de l'ITS1 entre les composts domestique et animal a permis de révéler une abondance plus élevée de la classe des Eurotiomycetes dans le compost animal. Cette différence s'est traduite par une plus grande abondance des Ascomycota dans le compost domestique. Les taxons identifiés dans les deux types de compost ont été répartis entre les huit classes de moisissures suivantes : Eurotiomycetes, Saccharomycetes, Sordariomycetes, Dothideomycetes, Agaricomycetes, Pezizomycetes, Microbotryomycetes et Tremellomycetes.

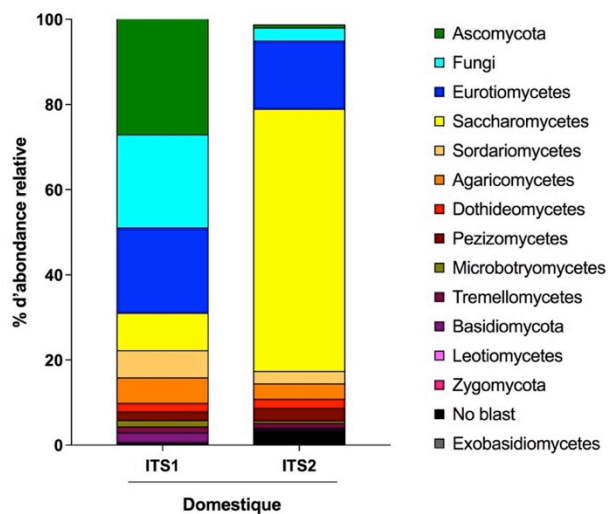


Figure 5 : Abondance relative des classes de moisissures obtenues par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 provenant du compost domestique.

Le profil fongique est plus diversifié et mieux réparti lors de l'utilisation de la région ITS1. Les pourcentages d'abondance relative montrent que le phylum des Zygomycota et la classe des Exobasidiomycetes n'ont été révélés que par l'ITS1. La classe des Saccharomycetes occupe plus de 60 % du profil taxonomique obtenu par l'ITS2.

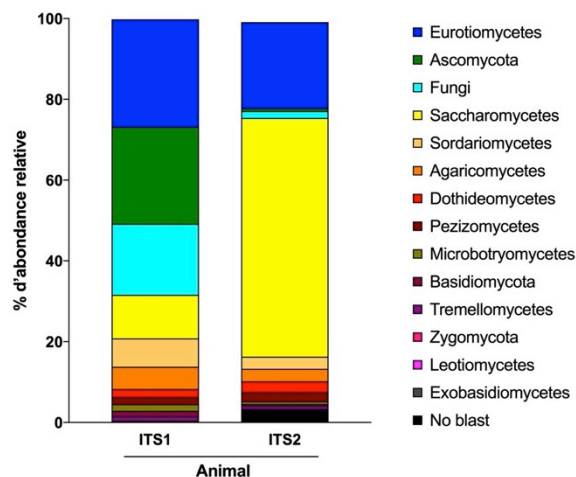


Figure 6 : Abondance relative des classes de moisissures obtenues par le séquençage des régions ITS1 et ITS2 provenant du compost animal.

Le profil fongique est plus diversifié et mieux réparti lors de l'utilisation de la région ITS1. Les pourcentages d'abondance relative montrent que le phylum des Zygomycota et la classe des Exobasidiomycetes n'ont été révélés que par l'ITS1. La classe des Saccharomycetes occupe plus de 70 % du profil taxonomique obtenu par l'ITS2.

L'identification des taxons a été analysée de plus près en allant jusqu'aux genres de moisissures déterminées par l'ITS1 et l'ITS2 (figure 7). Les genres de moisissures représentées

dans la figure 7 ont une abondance relative d'au moins 1 % du total. Parmi les genres les plus abondants, l'ITS1 semble offrir une meilleure distribution de moisissures comparativement à l'ITS2. En effet, la famille des *Saccharomycetales* représente plus de 50 % des séquences identifiées par l'ITS2. De plus, six moisissures ne figurent pas dans la liste des genres identifiés par l'ITS2. Il s'agit de l'ordre des *Eurotiales*, les genres *Acremonium*, *Malassezia*, *Capnobotryella*, *Cybelindnera* et *Leucosporidium*. D'un autre côté, *Trichomonascus*, *Malbranchea* et *Sordariales* n'ont pas été détectées parmi les moisissures les plus abondantes de l'ITS1. En revanche, il est important de noter que ces trois moisissures figurent dans le reste de la liste des genres de moisissures identifiées par l'ITS1 (moins de 1 % du total), à la différence des six moisissures mentionnées ci-haut qui ont été détectées à 0 % par l'ITS2. De plus, les séquences non identifiées sont présentes uniquement dans la liste de l'ITS2 (figure 2). De même que pour la classe des moisissures (figures 4 à 6), il y a une similarité entre les profils fongiques obtenus lorsque chacun des deux types de compost est analysé individuellement.

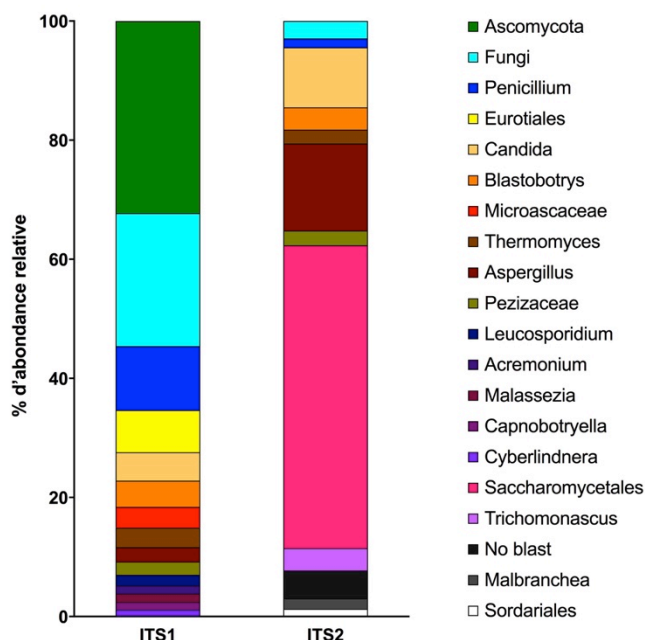


Figure 7 : Abondance relative des genres de moisissures identifiées par le séquençage des régions ITS1 et ITS2.

*Dans le cadre des limites de la représentation graphique, seulement les moisissures présentes à plus de 1 % du total sont représentées dans la figure. Il est possible d'observer que l'ITS1 permet l'identification d'un plus grand nombre de moisissures avec une meilleure distribution de l'abondance. La famille des *Saccharomycetales* occupe plus de 50 % de la liste des moisissures détectées par l'ITS2.*

5.2 Optimisation du rendement de la méthode d'extraction de l'ADN fongique et de son applicabilité à des échantillons d'air provenant des usines de biométhanisation

5.2.1 Consortium microbien

Afin d'optimiser le rendement d'extraction d'ADN fongique des échantillons d'air, deux approches de concentration des spores ont été évaluées. La centrifugation et la filtration couplée à une extraction d'ADN, suivi d'une réaction PCR en temps réel, ont été appliquées sur un consortium microbien contenant trois moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*) et une bactérie (*Bacillus*). Les deux approches ont été estimées sous deux conditions : avec et sans Tween 20. La réaction d'amplification ciblait un gène commun aux genres *Penicillium* et *Aspergillus* (PenAsp). La figure 8 présente une comparaison de la concentration de *Penicillium* et d'*Aspergillus* dans les échantillons centrifugés et filtrés, avec et sans Tween 20. Chaque point de la figure représente un réplica de l'expérience. Tout d'abord, il est possible de remarquer l'effet du détergent sur la récupération des spores fongiques. Selon les deux méthodes, l'utilisation du Tween 20 a permis d'obtenir une concentration de *Penicillium* et d'*Aspergillus* plus élevée. La différence entre les deux conditions est d'environ deux log aussi bien lors de la centrifugation que lors de la filtration. Ensuite, une différence de concentration de *Penicillium* et d'*Aspergillus* est notée entre les deux méthodes d'extraction. En effet, la filtration a permis de récupérer une concentration 10 fois plus élevée de spores de *Penicillium* et d'*Aspergillus*, et ce, dans les deux expériences.

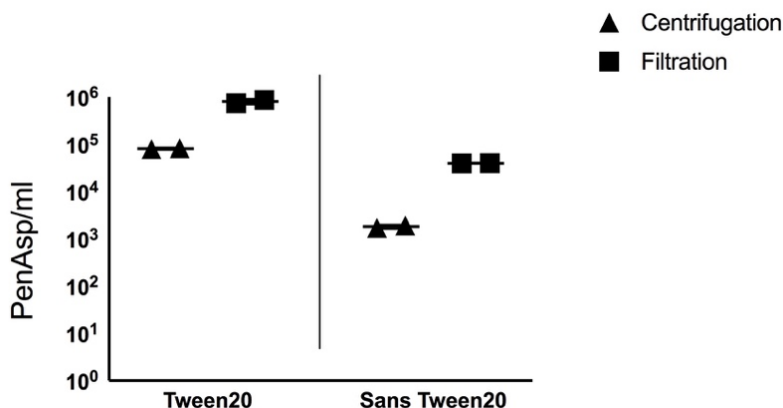


Figure 8 : Concentration de *Penicillium* et d'*Aspergillus* (PenAsp) en utilisant les protocoles de centrifugation et de filtration sur les échantillons de consortium microbien.

*Le consortium microbien est formé de trois moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*) et une bactérie (*Bacillus*). La filtration permet une meilleure récupération de spores fongiques comparée à la centrifugation. L'utilisation du Tween 20 permet d'améliorer cette récupération.*

5.2.2 Échantillons d'air des usines de biométhanisation

Pour confirmer les résultats obtenus par la comparaison des deux approches sur un consortium microbien, des échantillons d'air environnementaux ont été soumis au même traitement. Les

bioaérosols récoltés par le Coriolis dans les usines de biométhanisation ont été séparés en deux parties. La première partie a subi le protocole de filtration nouvellement développé et la seconde partie a été centrifugée selon le protocole standard. L'efficacité des deux approches incluant l'utilisation de Tween 20 dans la concentration des spores fongiques a été évaluée en ciblant spécifiquement les genres *Penicillium* et *Aspergillus* (PenAsp). La figure 9 indique les concentrations de *Penicillium* et d'*Aspergillus* dans les échantillons filtrés et centrifugés. Dans la première usine de biométhanisation (UB1), les cinq sites échantillonnés ont donné une concentration de *Penicillium* et d'*Aspergillus* plus élevée lorsque la filtration a été utilisée pour concentrer les échantillons. La différence entre les deux protocoles a atteint jusqu'à trois ordres de grandeur. Pareillement, les deux sites échantillonnés dans la seconde usine de biométhanisation (UB2) ont montré une concentration de *Penicillium* et d'*Aspergillus* 100 à 1000 fois plus élevée grâce à la filtration.

Ces résultats suggèrent fortement que le protocole de centrifugation appliqué au consortium microbien a mené à la perte de certaines spores de *Penicillium* et d'*Aspergillus*, comme démontré par la figure 8.

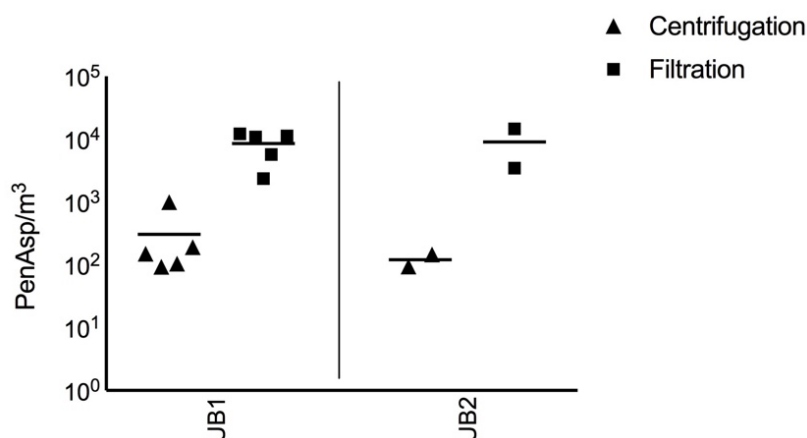


Figure 9 : Concentration de *Penicillium* et d'*Aspergillus* (PenAsp) obtenue par l'application des protocoles de centrifugation et de filtration sur les bioaérosols de deux usines de biométhanisation.

Chaque point de la figure représente un site échantillonné dans les deux usines visitées. L'application du protocole de filtration permet de récupérer 100 à 1000 fois plus de spores de *Penicillium* et d'*Aspergillus*.

Pour démontrer si la perte causée par la centrifugation affecte la diversité des échantillons d'air, l'approche SNG développée a été appliquée aux bioaérosols des usines de biométhanisation en ciblant l'ITS1. L'indice de diversité alpha et le nombre d'UTO observées ont été utilisés pour comparer les échantillons ayant été traités par le protocole de centrifugation et de filtration. Les échantillons d'air filtrés contiennent une plus grande proportion d'UTO observées (figure 10). La valeur maximale d'UTO est deux fois plus élevée dans les échantillons d'air traités avec la nouvelle méthode de concentration des spores basée sur la filtration comparativement à celle obtenue avec la méthode standard de centrifugation.

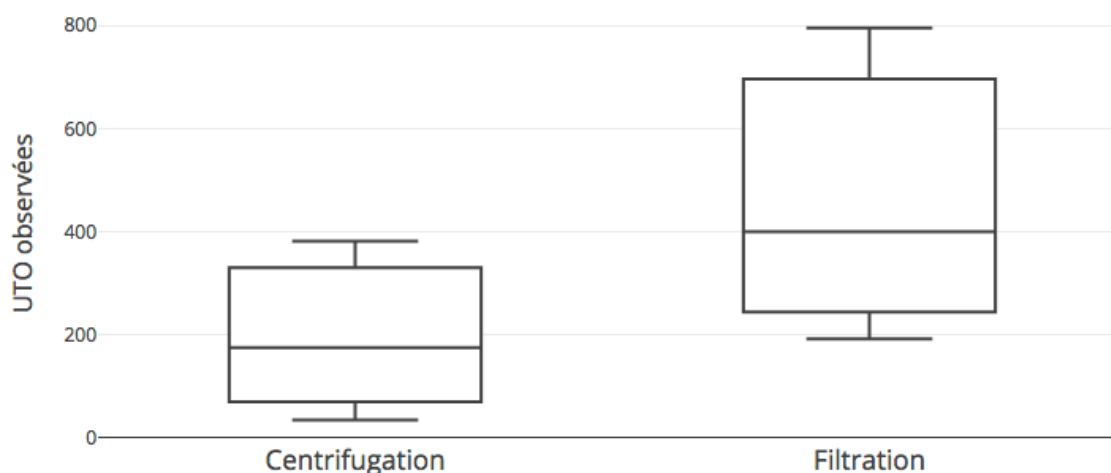


Figure 10 : Nombre d'UTO observées dans les échantillons de bioaérosols récoltés à l'aide du Coriolis dans les usines de biométhanisation, selon le protocole d'extraction utilisé.

La filtration donne un plus grand nombre d'UTO observées.

5.3 Application de l'approche SNG aux échantillons d'air des usines de biométhanisation

En tenant compte des résultats obtenus dans les sites de compostage à la suite de l'application d'une approche SNG ciblant les régions ITS1 et ITS2, il a été convenu que l'ITS1 permet une meilleure description de la diversité fongique des bioaérosols. Une richesse plus élevée et une meilleure distribution des différents taxons font de l'ITS1 un meilleur choix pour la description de l'exposition aux bioaérosols fongiques d'un environnement. C'est la raison pour laquelle l'approche développée avec l'ITS1 a été appliquée pour décrire l'exposition des travailleurs dans les usines de biométhanisation. De plus, la méthode de filtration élaborée dans ce projet a favorisé une optimisation du rendement d'extraction de l'ADN fongique. Cette méthode a été utilisée pour l'approche SNG. Ainsi, le protocole bio-informatique développé grâce aux échantillons d'air provenant des sites de compostage a été appliqué aux échantillons d'air des usines de biométhanisation dans le but de valider sa reproductibilité et sa fiabilité avec un nouveau jeu de données.

5.3.1 Classe des moisissures identifiées dans l'air des deux usines de biométhanisation

L'abondance relative des différents taxons a été analysée dans les deux usines (UB1 et UB2) selon l'échantillonnage effectué durant les saisons d'été et d'hiver. La figure 11 montre la distribution des taxons correspondants aux différentes classes de moisissures. Les deux usines ont été comparées l'une à l'autre en plus d'être estimées selon la saison de l'échantillonnage. Ainsi, un profil de diversité fongique différent est observé dans l'air des deux usines. En effet, la classe des *Agaricomycetes* semble être prédominante dans l'usine UB1. Dans l'usine UB2, c'est plutôt la classe des *Eurotiomycetes* qui est largement majoritaire. Une distribution plus égale des moisissures est ainsi observée dans l'usine UB1. Par ailleurs, une comparaison des échantillons d'air récoltés en été et en hiver dans l'usine UB1 montre une différence de profil

fongique considérable. Ainsi, l'abondance relative des *Agaricomycetes* est plus élevée comparativement aux autres classes de moisissures durant l'été, alors que celle des *Eurotiomycetes* s'accroît en hiver. Aussi, on peut voir un pourcentage élevé de moisissures non identifiées durant l'hiver comparativement à l'été. Par contre, dans l'usine UB2, la classe des *Eurotiomycetes* domine la composition de l'air durant les deux saisons.

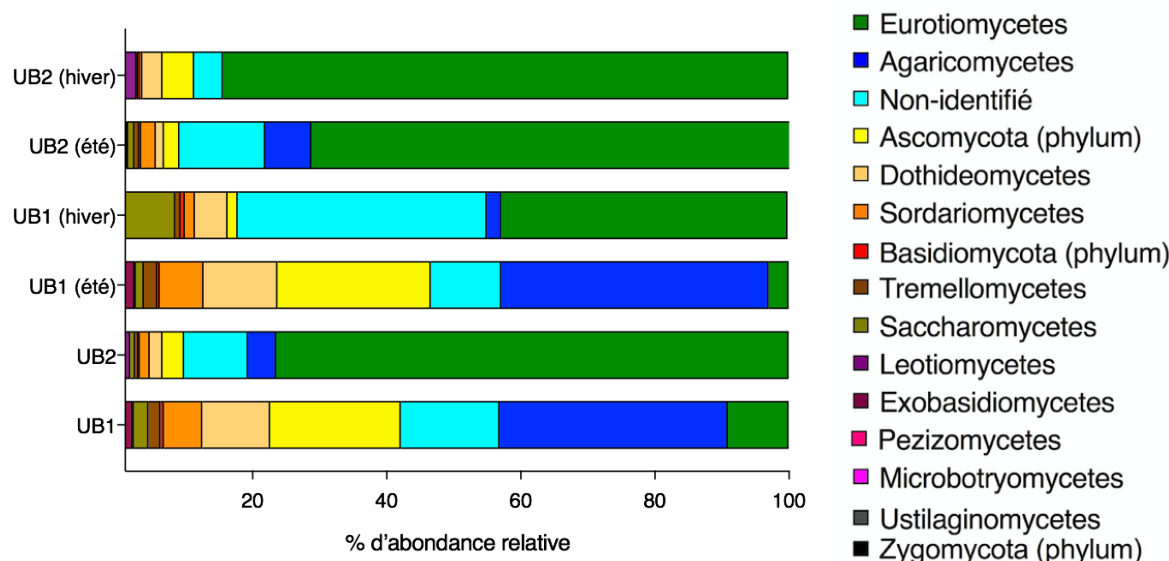


Figure 11 : Abondance relative des classes de moisissures identifiées dans l'air des deux usines de biométhanisation (UB1 et UB2) en été et en hiver.

La classe des Eurotiomycetes est prédominante dans l'usine UB2 (durant l'été et l'hiver) alors que l'usine UB1 présente un profil fongique plus varié. Cette variabilité peut se voir également en comparant les moisissures détectées en été et en hiver. Les Agaricomycetes dominent en été et les Eurotiomycetes dominent en hiver.

5.3.2 Genre des moisissures identifiées dans l'air des deux usines de biométhanisation

Afin de pousser l'analyse taxonomique plus loin, l'abondance relative des taxons a été analysée de façon plus attentive en dressant la liste des 20 genres de moisissures les plus abondants dans les deux usines durant les échantillonnages d'été et d'hiver. Dans l'usine UB1, seulement 8 des 20 genres de moisissures sont trouvés dans les deux visites (figure 12). En été, le genre *Hyphodontia* faisant partie de la classe des *Agaricomycetes* représente 40 % des genres de moisissures, suivi du genre *Davidiella* avec une abondance relative de 15 %. En hiver, les genres *Penicillium* et *Talaromyces* sont les plus abondants avec 62 % et 13 % d'abondance relative respectivement. En ce qui a trait à l'usine UB2, le genre *Penicillium* est largement majoritaire en été et en hiver avec une abondance relative de 82 % et 90 % respectivement (figure 13). On remarque que les échantillons d'air récoltés en été sont plus diversifiés que ceux prélevés en hiver. Ces derniers contiennent seulement 10 moisissures au total.

Il est important de noter que les profils de moisissures présentés dans cette sous-section sont constitués des 20 moisissures les plus abondantes. Le profil fongique est nettement plus diversifié lorsque l'on considère toutes les moisissures identifiées par l'approche. Il est difficile d'avoir une visualisation graphique optimale mettant de l'avant toutes les espèces de moisissures identifiées par la nouvelle méthode.

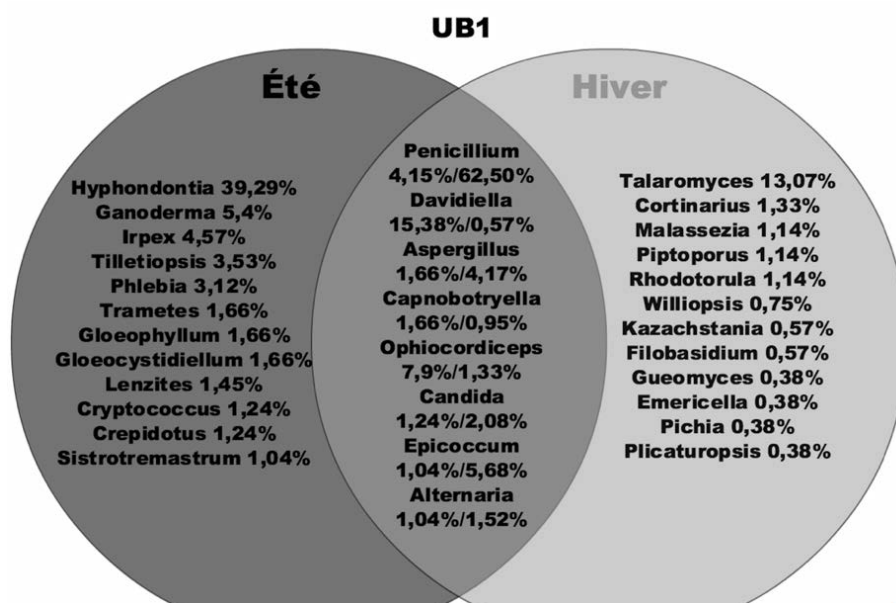


Figure 12 : Les 20 genres de moisissures les plus abondants dans chacune des visites de l'usine UB1.

Les résultats sont montrés sous forme de diagramme de Venn pour indiquer le lien taxonomique entre les deux saisons. Le pourcentage indique l'abondance relative de chacune des moisissures. Dans l'intersection, le pourcentage de chaque moisissure en été et en hiver est séparé par une barre oblique.

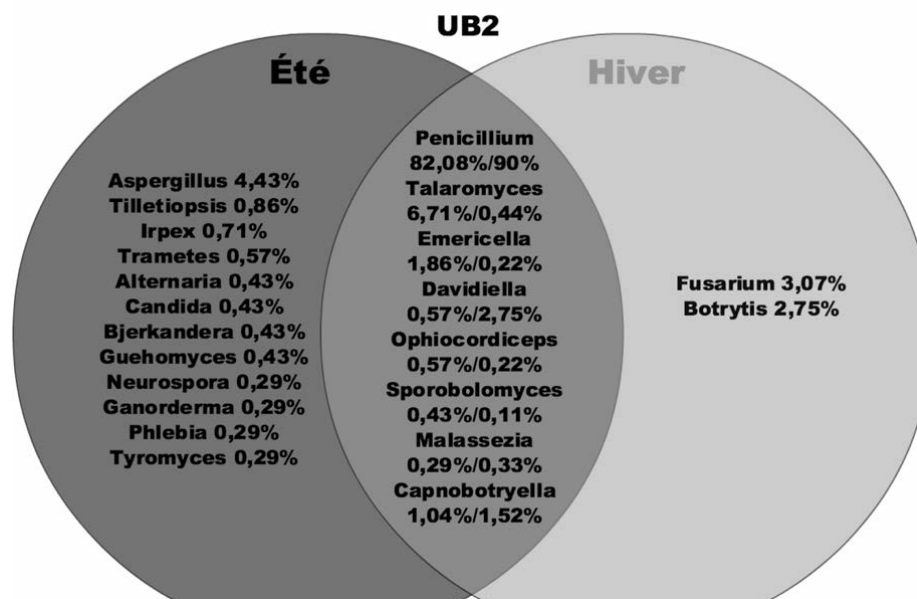


Figure 13 : Les 20 genres de moisissures les plus abondants dans chacune des visites de l'usine UB2.

Les résultats sont montrés sous forme de diagramme de Venn pour indiquer le lien taxonomique entre les deux saisons. Le pourcentage indique l'abondance relative de chacune des moisissures. Dans l'intersection, le pourcentage de chaque moisissure en été et en hiver est séparé par une barre oblique.

5.4 Application de l'approche dans les fermes laitières

Après avoir validé la reproductibilité du protocole bio-informatique dans les échantillons des usines de biométhanisation, l'approche développée dans le contexte du présent projet, incluant la nouvelle méthode d'extraction et ciblant l'ITS1 comme marqueur fongique, a été appliquée à des échantillons d'air provenant de cinq fermes laitières. En effet, l'utilisation de cette nouvelle approche dans un troisième environnement ainsi que la validité des résultats obtenus permet d'assurer son applicabilité à d'autres environnements caractérisés par une problématique d'exposition fongique. De plus, une comparaison entre la nouvelle approche moléculaire et les méthodes traditionnelles de culture a été réalisée.

5.4.1 Classe des moisissures identifiées dans l'air des cinq fermes laitières

Parmi les 12 classes de moisissures détectées dans les cinq fermes laitières, seulement 6 semblent dominer le profil de diversité. Il s'agit des *Eurotiomycetes*, *Dothideomycetes*, *Wallemiomycetes*, *Agaricomycetes*, *Sordariomycetes* et *Tremellomycetes* (figure 14). Il est intéressant de remarquer la variabilité du profil des cinq fermes laitières (FL1, FL2, FL3, FL4 et FL5). La classe des *Eurotiomycetes* est majoritaire dans les fermes FL3 et FL5. Dans la ferme FL2, ce sont les classes des *Dothideomycetes* et des *Wallemiomycetes* qui prédominent. La classe des *Sordariomycetes* est particulièrement plus abondante dans la ferme FL1 comparativement aux quatre autres. Par contre, la classe des *Tremellomycetes* est plus présente dans la ferme FL4. D'ailleurs, cette dernière a le profil fongique le plus diversifié

contrairement à la ferme FL3 où les *Eurotiomycetes* représentent 70 % de l'abondance relative. Aussi, la classe des *Ustilaginomycotina* a été détectée uniquement dans la ferme FL4.

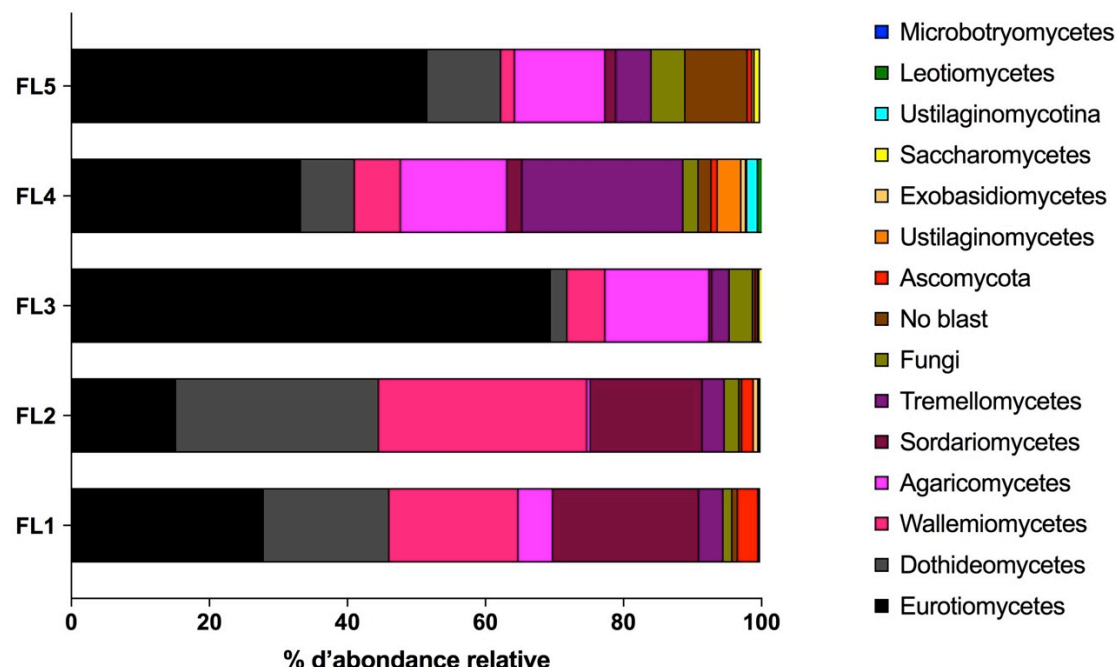


Figure 14 : Abondance relative des classes de moisissures identifiées dans l'air des cinq fermes laitières.

Malgré la détection de 12 classes de moisissures, seulement six d'entre elles sont les plus abondantes dans les cinq fermes (FL1 à FL5). Chacune des cinq fermes présente un profil de diversité fongique différent.

5.4.2 Comparaison des genres de moisissures identifiées par SNG et par culture

Les genres de moisissures représentant plus de 1% du total des moisissures détectées par séquençage de nouvelle génération (SNG) dans les cinq fermes sont cités dans la figure 15. En ce qui a trait aux genres de moisissures identifiées par culture, celles qui sont présentes plus d'une fois dans les cinq fermes regroupées sont également incluses dans la figure 15. Les moisissures n'ayant été détectées qu'une fois sont les suivantes: *Trichoderma*, *Microdochium*, *Phoma*, *Apiospora*, *Botrytis*, *Conyothirium*, *Millerozyma*, *Neosetophoma*, *Irpex*, *Debaryomyces*. L'abondance relative des moisissures détectées par culture a été calculée de la sorte : pour chaque moisissure, le nombre de fois où elle a été isolée dans les cinq fermes est calculé. Ensuite, la somme totale de tous ces nombres de moisissures a été calculée. En se basant sur cette somme, un pourcentage d'abondance relative a été associé à chacune des moisissures apparaissant dans la liste de la figure 15. Seulement quatre moisissures ont été détectées par les deux méthodes. Il s'agit de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bipolaris* et *Sarocladium*. Parmi les 16 autres figurant dans la liste des moisissures identifiées par culture, trois (*Hyphopichia*, *Gibellulopsis* et *Myceliophthora*) n'ont pas été détectées par la méthode SNG. En effet, même si elles ne figurent pas dans la liste présentée dans la figure 15, les 13 autres moisissures font partie de celles ayant un pourcentage d'abondance relative inférieur à 1 % du total. Il est important de rappeler qu'un grand nombre de moisissures sont détectées en bas du seuil de

1 % du total, rendant le profil de diversité par SNG plus important que ce qui paraît dans les graphiques d'abondance relative.

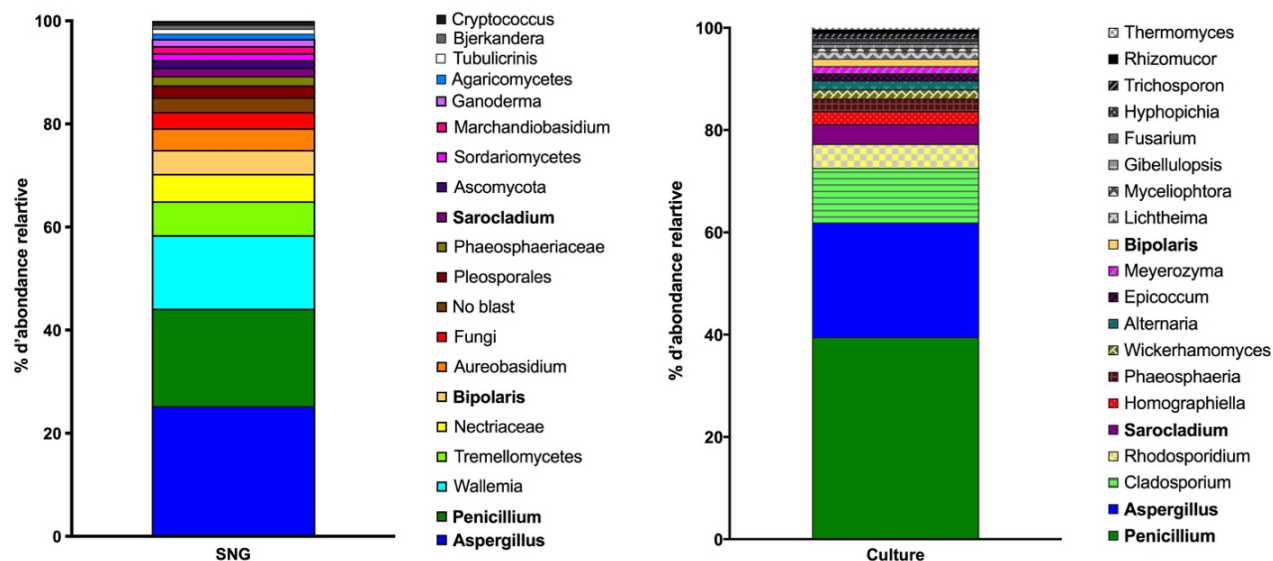


Figure 15 : Abondance relative des genres de moisissures identifiés par l'approche moléculaire (SNG) et par culture dans l'air des cinq fermes laitières.

Les moisissures identifiées par SNG et représentées dans la figure ont une abondance relative plus élevée que 1 % du total. Pour les moisissures identifiées par culture, seulement celles présentes plus d'une fois dans les cinq fermes sont représentées. Les moisissures marquées en caractère gras sont communes aux deux méthodes d'analyse.

6. DISCUSSION

6.1 Sites de compostage

La taille des amplicons générés par les nouvelles technologies SNG a mené à l'utilisation d'une des deux régions ITS1 ou ITS2 pour l'étude de la diversité fongique. Les seules études ayant comparé les deux régions ont utilisé la technologie du pyroséquençage (454) sur des échantillons d'eau, de sol ou de plantes. Les résultats obtenus semblent donner des avis mitigés sur la performance des deux régions (Bazzicalupo *et al.*, 2013; Blaadid *et al.*, 2013; Monard *et al.*, 2013). En considérant ces faits et en ayant recours à une technologie de séquençage d'actualité (MiSeq d'Illumina), des échantillons d'ADN provenant de bioaérosols des sites de compostage ont été utilisés pour comparer les deux régions au regard de la diversité des bioaérosols fongiques dans un contexte d'exposition des travailleurs. Le fait d'avoir comparé les deux régions avec le même jeu de données utilisées pour décrire l'exposition des travailleurs a permis une meilleure précision sur le choix de la région à utiliser. En effet, l'indice d'estimation de richesse Chao1 et les indices de diversité Shannon et Simpson sont utilisés depuis des décennies pour mesurer la diversité (Gotelli, 2008; Magurran, 2003). L'estimation de la richesse contenue dans un échantillon permet de comparer l'étendue de la diversité entre différents types d'échantillons. Ainsi, faisant l'unanimité dans les résultats portant sur la richesse/diversité et sur l'analyse taxonomique, la région ITS1 a été utilisée pour décrire l'exposition des travailleurs aux bioaérosols fongiques dans les sites de compostage. La reproductibilité des résultats obtenus concernant la performance des régions ITS1 et ITS2 dans la description de la diversité fongique dans les deux types de compost permet de renforcer la décision de l'utilisation de cette région pour l'étude de l'exposition des travailleurs. Ainsi, les conclusions tirées par la comparaison des indices de richesse/diversité et par la comparaison des profils taxonomiques obtenus par l'ITS1 et l'ITS2 se rejoignent, et ce, pour les deux types de compost.

Les résultats de l'étude en question ont été publiés dans le journal *Science of the Total Environment* (Mbareche *et al.*, 2017). Cette nouvelle approche a permis de démontrer l'influence de la matière première compostée sur la composition fongique. Cette influence a été observée dans les aérosols émis lors des tâches liées au procédé de compostage et impliquant les travailleurs présents sur le site. La classe des *Eurotiomycetes*, surabondante dans les échantillons de compost animal, est responsable de la variation de composition fongique entre les deux types de compost. Au fait, cette classe de moisissure serait impliquée dans la dégradation de carcasses animales. En résumé, l'application de cette nouvelle approche a permis de dévoiler un large profil de diversité fongique, révélant la présence d'un certain nombre de pathogènes fongiques nouvellement identifiés dans les bioaérosols émis par des sites de compostage. Les auteurs de l'étude ont émis des suggestions concernant des mesures de prévention pour les travailleurs des sites de compostage.

6.2 Optimisation du rendement d'extraction de l'ADN fongique

La concentration des échantillons d'air est une étape primordiale lors de l'utilisation des méthodes de biologie moléculaire. Effectivement, l'air peut contenir des concentrations relativement faibles de contaminants microbiens en comparaison à d'autres échantillons environnementaux comme l'eau et le sol. La centrifugation pour concentrer les bactéries et les archées dans les échantillons d'air est une méthode communément utilisée (Cayer *et al.*, 2007; Blais Lecours *et al.*, 2012; Nehmé *et al.*, 2008, 2009). En revanche, les moisissures sont

particulièrement difficiles à centrifuger en raison de leurs nombreuses particularités incluant la charge, une densité faible, ainsi que la présence d'une protéine appelée l'hydrophobine qui les rend hydrophobes. Un protocole de concentration des spores fongiques avant l'extraction de l'ADN a été développé pour cette étude. L'application de ce nouveau protocole sur un consortium microbien contenant les genres *Penicillium* et *Aspergillus* a permis de récupérer 10 fois plus de spores comparativement au protocole standard de centrifugation utilisant une PCR en temps réel spécifique aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. L'utilisation d'une cible spécifique pour quantifier la perte accrédite l'hypothèse de la perte de spores fongiques lors de l'élimination du surnageant inclus dans la méthode de centrifugation. L'hydrophobicité des spores de moisissures pourrait être une des raisons expliquant cette perte. En outre, l'application de la méthode d'extraction fongique optimisée sur des échantillons environnementaux récoltés à des moments différents, dans différents sites et dans deux usines, renforce la validité des résultats. Ainsi, même si les conditions et les sources de bioaérosols sont différentes, le fait de traiter les échantillons avec la méthode de filtration nouvellement développée a mené à détecter un nombre de *Penicillium* et d'*Aspergillus* par mètre cube d'air plus élevé que dans les échantillons centrifugés. Au vu de ces résultats, le besoin de vérifier si la perte de spores fongiques causée par la centrifugation affecte la diversité était nécessaire. Par conséquent, l'approche par SNG a permis la caractérisation de l'effet de la centrifugation sur la diversité fongique. Le fait que le nombre d'UTO observées dans les 14 échantillons des usines de biométhanisation était plus élevé lors de l'application de la méthode de filtration suggère une diversité plus importante dans les échantillons d'air filtrés comparativement aux échantillons centrifugés. Comme prévu, la perte de spores fongiques n'est pas limitée aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. La centrifugation affecte clairement la diversité et la richesse des bioaérosols fongiques. De façon générale, la filtration a permis une meilleure récupération de spores spécifiques (*Penicillium* et *Aspergillus*) et d'un plus grand nombre d'UTO.

6.3 Application de la procédure SNG aux échantillons d'air provenant des usines de biométhanisation

L'application de l'approche SNG ciblant l'ITS1 et utilisant un protocole bio-informatique personnalisé dans un nouvel environnement représente un atout majeur pour tester la reproductibilité de l'approche et valider la fiabilité des résultats. L'exposition des travailleurs dans les usines de biométhanisation aux bioaérosols fongiques est un contexte idéal pour tester la nouvelle approche. En effet, des différences dans les profils fongiques des bioaérosols démontrent la précision de la méthode.

Les variations du portrait de la diversité entre les deux usines visitées peuvent être expliquées par l'influence des déchets traités dans chacune d'elles. Ces résultats corroborent ceux obtenus dans les sites de compostage concernant l'influence de la matière première compostée sur la composition fongique des bioaérosols. En outre, l'environnement avoisinant les usines peut jouer un rôle important à l'égard de la composition fongique des bioaérosols selon les différentes sources potentielles de moisissures présentes. Cette hypothèse est d'autant plus plausible lors des visites d'été, car l'air intérieur dans les usines n'est pas confiné. À titre d'exemple, l'usine UB2 renfermait des piles de compost à proximité des installations de biométhanisation qui auraient pu influencer les moisissures détectées dans l'usine. L'impact écologique des *Agaricomycetes* se caractérise par une activité de décomposition de bois et de symbiote ectomycorhizien. La présence d'une plus grande proportion de produits provenant de plantations agricoles peut expliquer la détection de cette classe de moisissures. Par ailleurs, la classe des *Eurotiomycetes* est liée à des procédés tels que la fermentation utilisée pour la

production alimentaire. En plus, plusieurs genres de moisissures faisant partie de cette classe sont des décomposeurs naturels et sont impliqués dans l'altération des aliments. La présence de produits alimentaires naturels ou transformés (fruits, légumes, produits laitiers, etc.) peut expliquer la détection des *Eurotiomycetes* dans l'air des usines de biométhanisation.

Certaines des moisissures identifiées sont communément trouvées dans des environnements reliés au traitement des déchets. Une autre partie des moisissures détectées comprend des genres ubiquitaires du bois et de débris de plantes, et d'autres sont des pathogènes des cultures agroalimentaires. Les différences d'abondance entre les deux saisons sont expliquées soit par l'apport direct de la source (déchets présents au moment de l'échantillonnage) soit par l'influence de l'environnement extérieur.

De façon générale, l'application de cette nouvelle approche a favorisé l'obtention d'une grande diversité de moisissures dans les bioaérosols présents dans les usines de biométhanisation. La présence d'un portrait aussi diversifié dans l'air pourrait symboliser un risque potentiel pour les travailleurs. Effectivement, un des mécanismes physiopathologiques des moisissures est la production de mycotoxines. Plusieurs mycotoxines peuvent être générées par une moisissure et une mycotoxine peut être générée par plusieurs moisissures. Cette exposition pourrait avoir des effets néfastes sur la santé. De plus, il est possible que, pour certaines de ces moisissures, l'activité allergène et/ou l'infectivité ne soient pas encore démontrées. Ces facteurs pourraient augmenter le risque encouru par les travailleurs. De façon plus spécifique, la présence de 5 moisissures avec une activité allergène et/ou pathogène opportuniste connue a été détectée, soit *Aspergillus*, *Malassezia*, *Emmericella*, *Fusarium* et *Candida*. L'exposition quotidienne des travailleurs des usines de biométhanisation à ces moisissures pourrait représenter un risque pour la santé. Le port d'équipements de protection respiratoire et épidermique est suggéré pour prévenir les effets nocifs liés à l'exposition.

6.4 Fermes laitières

Dans le but de comparer la méthodologie développée aux méthodes de dénombrement et d'identification classiques des moisissures, l'environnement des fermes laitières a été choisi en raison de leur grande diversité fongique. De plus, l'échantillonnage de ce troisième environnement permet de confirmer la robustesse de l'approche conçue au cours de ce projet et d'assurer son applicabilité à d'autres environnements d'exposition aux bioaérosols fongiques. Ainsi, le fait d'avoir échantillonné l'air de cinq fermes laitières différentes a permis d'ajouter l'effet de variabilité des profils fongiques. Effectivement, cet effet est une confirmation de la précision de la méthode SNG puisqu'il a été possible d'identifier toutes les moisissures responsables de cette variation de profils. Les résultats obtenus témoignent de la capacité de la méthode à mettre en lumière la présence du plus grand nombre possible de représentants de la population fongique.

Sur le plan de l'abondance, les différences observées entre les profils fongiques obtenues par l'approche SNG et par les méthodes de culture peuvent être expliquées par l'hypothèse suivante : les méthodes de culture permettraient de donner un avantage aux moisissures faisant partie de la biosphère rare. En effet, les résultats de la présente étude sont en quelque sorte conformes à ceux de Shade et de ses collaborateurs, qui ont démontré la complémentarité des deux approches. En effet, l'hypothèse qu'ils avancent est que les méthodes de culture permettent de révéler les bactéries de la biosphère rare et apporte une information complémentaire aux méthodes SNG (Shade *et al.*, 2012). Il est important de noter que dans ce projet, cette complémentarité entre les deux approches n'est observée que lorsque

l'on parle d'abondance. Effectivement, seulement trois moisissures ont été détectées exclusivement par la méthode de culture. En contrepartie, plus de 100 moisissures ont été identifiées par l'approche SNG. À la connaissance des auteurs, c'est la première fois qu'une étude démontre ce phénomène de biosphère rare chez les moisissures. De façon plus claire, les méthodes de culture révéleraient les moisissures les moins abondantes dans un environnement. Cela dit, les résultats de la présente étude confirment l'hypothèse de départ concernant l'obtention d'un profil de diversité beaucoup plus riche grâce à l'approche SNG. L'application d'une telle approche permet de révéler des moisissures d'intérêt et de donner une meilleure description de l'exposition des travailleurs aux bioaérosols fongiques. À titre d'exemple, *Wallemia*, qui a été détectée uniquement par la méthode SNG, est le troisième genre de moisissures le plus abondant. Ce genre fongique est suspecté de causer une sensibilisation allergique (Conrad *et al.*, 2013).

6.5 Limites et contraintes

Ce projet comporte certaines limites. En ce qui concerne l'échantillonnage sur le terrain, il a été effectué durant dix minutes à chaque prise d'échantillon. Cette durée ne couvre pas la totalité du quart de travail au cours duquel les travailleurs en question sont exposés. Ainsi, le fait de prendre trois échantillons à chaque site permet d'avoir une meilleure représentativité de l'exposition durant le moment de l'échantillonnage. Il n'en est pas moins vrai qu'il s'agit d'une bonne estimation de l'exposition. De plus, les liquides de collection des échantillonneurs liquides sont sujets à de l'évaporation dépendamment de l'environnement et du taux d'humidité. Cette perte de liquide pourrait être responsable d'un déséquilibre de la diversité microbienne des échantillons. Les microorganismes hydrophobes ou les particules hydrophobes portant les microorganismes seraient plus affectés par l'évaporation, ce qui contribuerait à une dysbiose entre les échantillonnages liquide et sec. Une récente étude en cours de publication a comparé des échantillonneurs liquide et sec. Malgré une plus grande richesse et diversité détectée par l'échantillonneur sec, les profils taxonomiques étaient similaires entre les deux types d'échantillonneurs en ce qui a trait aux taxons les plus abondants. Aussi, le phénomène d'aérosolisation préférentielle peut contribuer à la perte lors de l'échantillonnage liquide. L'hypothèse est que certains microorganismes seraient préférentiellement aérosolisés comparativement à d'autres. Des études futures sont nécessaires afin de mieux comprendre ce phénomène d'aérosolisation préférentielle et de caractériser la flore microbienne perdue lors de l'échantillonnage liquide.

Aussi, l'utilisation d'une communauté fongique modèle (*mock community*) serait judicieuse afin de valider la qualité du séquençage et de prendre en considération la présence de séquences contaminées dans les échantillons. Cet échantillon modèle pourrait subir le même traitement que les échantillons d'air récoltés afin qu'il puisse être utilisé comme référence. Pour l'analyse taxonomique, des échantillons de contrôle sans activité et des échantillons de contrôle extérieurs pourraient être utilisés comme référence afin d'être comparés aux autres sites d'échantillonnage.

Les usines de biométhanisation échantillonnées sont nouvellement construites et les quantités de matières organiques traitées ne sont pas encore représentatives des objectifs souhaités. Il est attendu que l'exposition des travailleurs aux bioaérosols fongiques augmentera lorsque les usines auront atteint leurs objectifs de production finaux.

En ce qui a trait à l'identification des moisissures, l'ITS2 est une région beaucoup moins sollicitée que l'ITS1 dans les études d'écologie fongique utilisant les méthodes SNG. Par conséquent, les séquences provenant du séquençage de la région ITS2 sont moins représentées dans les bases de données que celles de l'ITS1. Étant donné que le SNG génère des quantités énormes de séquences, cela peut représenter une limite dans l'identification de nouvelles moisissures basées sur la comparaison des séquences avec les bases de données. Toutefois, l'étude des échantillons écologiques à l'aide d'outils engendrant un nombre gigantesque de données repose sur différentes approches dont celles des UTO. En effet, cette approche permet d'utiliser une variété de méthodes pour calculer des paramètres écologiques comme la richesse, la diversité ou encore la similarité entre différents échantillons. Cependant, la région ITS (ITS1 et ITS2) est sujette à une variabilité intraspécifique qui affecte son utilisation pour l'identification des espèces. L'identification taxonomique dépend de l'utilisation des bases de données. Malgré que les séquences ITS soient les plus représentées dans les bases de données de moisissures, il faut garder en tête que l'identification jusqu'au rang taxonomique de l'espèce pourrait être biaisée par cette variabilité entre les séquences d'une même espèce. La conséquence de cela pourrait inclure une identification de deux espèces différentes de la même séquence ITS.

6.6 La portée et l'applicabilité des résultats

Selon les résultats obtenus, la région ITS1 s'avère être un meilleur choix pour décrire de façon plus détaillée la diversité fongique des bioaérosols. Le degré de précision permis par la méthodologie développée est démontré par l'obtention de larges profils fongiques dans chacun des trois environnements étudiés. De plus, cette approche a su révéler la variabilité des moisissures d'un même environnement dans des conditions différentes. Cette constatation assure l'applicabilité de l'approche à d'autres environnements caractérisés par la présence de moisissures dans l'air. Aussi, l'optimisation de la méthode d'extraction de l'ADN fongique fondée sur la filtration a permis un meilleur rendement de récupération de spores fongiques. Cette récupération a une influence directe sur la diversité fongique d'un échantillon. Ainsi, grâce à l'application de la nouvelle méthode de filtration couplée à la nouvelle approche SNG, la diversité fongique d'un environnement sous différentes conditions pourra être déterminée avec précision afin d'évaluer le risque réel encouru par les travailleurs.

Afin de pallier les lacunes historiques des méthodes classiques utilisées dans l'étude de la biodiversité fongique des échantillons d'air, une comparaison entre l'approche SNG et par culture a été réalisée. Les résultats obtenus montrent que la description des moisissures est beaucoup plus précise et exhaustive avec l'utilisation de la méthode moléculaire. Cette méthode sera publiée par l'entremise de plusieurs publications scientifiques qui font l'objet d'une évaluation par les pairs portant sur la description de l'exposition des travailleurs dans trois environnements (compost, biométhanisation et fermes laitières) et sur l'optimisation de la méthode d'extraction de l'ADN fongique, en plus d'une publication comparant les régions ITS1 et ITS2.

Cette méthodologie est un avancement des connaissances relatives à l'exposition des travailleurs. Son utilisation dans les protocoles associés à l'étude des bioaérosols fongiques sera nécessaire et permettra de mieux comprendre le rôle des bioaérosols fongiques dans le développement des maladies pulmonaires professionnelles.

7. CONCLUSION

Les bioaérosols représentent une préoccupation majeure pour la santé des travailleurs qui n'est pas étrangère aux lacunes de la littérature à l'égard des moisissures et de leurs effets sur la santé au travail. Les méthodes utilisées jusqu'à présent constituent les principales limites des connaissances.

Dans ce projet de recherche, une méthode d'analyse complète sur l'étude des moisissures est proposée. Celle-ci permet d'optimiser le rendement de l'extraction de l'ADN fongique et de décrire précisément la diversité fongique des bioaérosols. Elle met l'accent sur l'importance de la région génomique fongique à cibler pour le séquençage à haut débit et permet de déterminer l'apport des méthodes de culture à la diversité des moisissures détectées. Il est important de mentionner que les environnements de travail touchés par la présence fongique dans l'air ont jusqu'à maintenant été décrits surtout par les méthodes de culture. La précision apportée par la nouvelle méthode a permis de suivre les variations des profils fongiques dans trois environnements différents révélant ainsi un bon nombre de moisissures nouvellement décrites dans les bioaérosols.

Au-delà de l'association entre les moisissures et leur effet sur la santé humaine, l'approche développée aura des retombées plus grandes : optimisation de protocoles, développement d'une méthode d'analyse bio-informatique, description fongique de divers environnements et mise au point d'une approche d'évaluation du risque d'exposition. L'usage de cette approche et les résultats de la présente recherche seront essentiels pour l'avancement des connaissances liées à l'étude de l'aéromycologie, une discipline pour laquelle l'intérêt est grandissant. La qualité de l'air et les problèmes d'exposition aux moisissures continuent de nourrir des inquiétudes au sein des responsables de la santé au travail et de la santé publique. Ainsi, les résultats obtenus serviront pour de futures études sur l'exposition des bioaérosols fongiques et les risques encourus dans divers environnements. Une future piste de recherche consisterait en l'utilisation d'une approche de séquençage de nouvelle génération ciblant plusieurs gènes d'intérêt afin de mieux comprendre le lien entre les deux régions ITS1 et ITS2 dans la description des moisissures.

BIBLIOGRAPHIE

ADEME. (2009). Guide méthodologique pour le suivi d'une installation de méthanisation. Tiré de https://www.biomasse-normandie.org/IMG/pdf/2009-07_Rapport_final_version_ADEME.pdf

Angelidaki I., Karakashev D., Batstone D.J., Plugge C.M. et Stams A.J.M. (2011). Chapter sixteen - Biomethanation and its potential. *Methods in Enzymology*, 494:327-351.

Bazzicalupo A.L., Bălint M. et Schmitt I. (2013). Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology*, 6(1):102-109.

Blaalid R., Kumar S., Nilsson R.H., Abarenkov K., Kirk M. et Kau Serud H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2): 218-224.

Blais Lecours P., Veillette M., Marsolais D. et Duchaine C. (2012). Characterization of bioaerosols from dairy barns: Reconstructing the puzzle of occupational respiratory diseases by using molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9):3242-3248. doi:10.1128/AEM.07661-11.

Bünger J., Antlauf-Lammers M., Schulz T.G., Westphal G.A., Müller M.M., Ruhnau P. *et al.* (2000). Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occup Environ Med*, 57: 458-464.

Bush R.K., Portnoy J.M., Saxon A., Terr A.I. et Wood R.A. (2006). The medical effects of mold exposure. *J Allergy Clin Immunol*, 117(2): 326-333.

Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K. *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5): 335-336.

Cayer M.-P., Veillette M., Pageau P., Hamelin R., Bergeron M.-J., Mériaux A., Cormier Y. *et Duchaine C.* (2007). Identification of mycobacteria in peat moss processing plants: application of molecular biology approaches. *Can J Microbiol*, 53(1): 92-99.

Conrad A., Seiwert M., Hünken A., Quarcoo D., Schlaud M. *et Groneberg D.* (2013). The German Environmental Survey for Children (GerES IV): reference values and distributions for time-location patterns of German children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(1): 25–34.

Crook B., *et* Burton C.N. (2010). Indoor moulds Sick Building Syndrome and building related illness. *British Mycological Society. Fungal Biology Reviews*, 24(3-4): 106-113.

Dairy Farmers of Canada, (2015). The economic impact of the dairy industry in Canada. Tiré de : <https://www.dairyfarmers.ca/news-centre/news/policy/study-highlights-the-growth-impact-and-importance-of-the-canadian-dairy-sector>.

De Gannes V., Eudoxie G. *et* Hickey W.J. (2013). Insights into fungal communities in composts revealed by 454-pyrosequencing: implications for human health and safety. *Frontiers in microbiology*, 4(164): 1-9.

Douwes J., Thorne P., Pearce N. *et* Heederick D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.*, 47(3): 187-200.

Duchaine C., Mériaux A., Brochu G. *et* Cormier Y. (1999). Airborne microflora in Quebec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives. *Am Ind Hyg Assoc J*, 60(1): 89-95.

Duchaine C., Mériaux A., Thorne S.P. et Cormier Y. (2000). Assessment of Particulates and Bioaerosols in Eastern Canadian Sawmills. *American Industrial Hygiene Association*, 61 (5), 727-732.

Edgar, R.C. (2013) UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads, *Nature Methods*. doi.org/10.1038/nmeth.2604.

Edgar,RC, Haas,BJ, Clemente,JC, Quince,C, Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection, *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381. Pubmed 21700674.

Epstein E. (1996). *The science of composting* (Vol. part I). Florida, USA: CRC press.

Floudas D. *et al.* (2012). The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science*, 336, 1715-1719.

Fogelmark B., Sjostrand M. et Rylander R. (1994). Pulmonary inflammation induced by repeated inhalations of f(1,3)-D-glucan and endotoxin. *Int.J.Exp.Path.*, 75, 85-90.

Fuchs J. (2003). Le compost de qualité au service de la santé des plantes. *Aletr Agri*, 61, 7-9.

Fung F. et Clark F.R. (2004). Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Journal of Toxicology*, 42 (2), 217-234.

Garett M.H., Rayement P.R., Hooper M.A., Abramson M.J. et Hooper B.M. (1998). Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clinical and experimental allergy*, 28, 459-467.

Georgianna R.D. et Payne G.A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 113-125.

Gotelli N.J. (2008). *A primer of ecology* 4th Edition. Chapter 9: Measuring species diversity. Sinauer Associates. Oxford University Press, ISBN-13: 978-0878933181

Hansgate A.M., Schloss P.D., Hay A.G. et Walker L.P. (2005). Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 209-214.

Haug R.T. (1993). *The Practical Handbook of Compost Engineering*. Florida, USA: Lewis Publishers.

Hawksworth DL. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research* 95.6: 641-655.

Hoornweg D. et Bhada-Tata, P. (2012). What a Waste: A Global Review of Solid Waste Management. Urban development series; knowledge papers no. 15. World Bank, Washington, DC. ©World Bank. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/17388>, License: CC BY 3.0 IGO

Hoorman J.J. (2011). *The Role of Soil Fungus. Fact sheet: Agriculture and Natural Resources*, The Ohio state university, Ohio.

Höppe P. et Martinac I. (1998). Indoor climate and air quality. *International Journal of Biometeorology*, 42 (1), 1-7.

Huber G. et Schaub C. (2011). *La fertilité des sols : L'importance de la matière organique*. Service Environnement-Innovation, Bas-rhin.

- Husman T. (1996). Health effects of indoor-air microorganisms. *Scand J Work Environ Health*, 22 (1), 5-13.
- Huttunen K., Pelkonen J., Nielsen K.F., Nuutinen U., Jussila J., et Hirvonen M.-R. (2004). Synergistic Interaction in Simultaneous Exposure to *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum*. *Environmental Health Perspectives*, 112 (6), 659-665.
- Kakde U.B. (2012). Fungal bioaerosols: global diversity, distribution and its impact on human beings and agricultural crops. *Bionano Frontier*, 5 (2), 323-329.
- Karsh-Mizrachi I., Nakamura Y. et Cochrane G. (2011). The International Nucleotide Sequence Database Collaboration. *Nucleic Acids Research*, 1-5.
- Klaric M.S., Varnai V.M., Calusic A.L. et Macan J. (2012). Occupational exposure to airborne Fungi in two Croatian sawmills and atopy in exposed workers. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19 (2), 213-219.
- Lacey J. et Dutkiewicz J. (1994). Bioaerosols and occupational lung disease. *J. Aerosol. Sci*, 25 (8), 1371-140.
- Langarica-Fuentes A., Zafar U., Heyworth A., Brown T., Fox G. et Robson G.D. (2014). Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecology*, 88, 396-308.
- Latgé J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (2), 310-350.
- Le Goff O., Bru-Adan V., Bacheley H., Godon, J. J., Wéry, N. (2010). The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting. *J Appl Microbiol.*, 108(1):325-40. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04427.
- Lues F.R., Theron M.M., Venter P., et Raspehi M.H.R. (2007). Microbial Composition in Bioaerosols of a High-Throughput Chicken-Slaughtering Facility. *Poultry Science*, 86, 146-149.
- Magurran A.E. (2003). *Measuring Biological Diversity*. Chapter 3: An index of diversity. Wiley-Blackwell, ISBN: 978-0-632-05633-0
- Mbareche H., Veillette M., Bonifait L., Dubuis ME., Bernard Y., Bilodeau G.J. et Duchaine C. (2017). A next generation sequencing approach with a suitable bioinformatics workflow to study fungal diversity in bioaerosols released from two different types of composting plants. *Sci.Total Environ.*, 601-602 :1306-1314.
- Meheust D., Le Cann P., Reboux G., Millon L, et Gangneux J.P. (2014). Indoor fungal contamination: Health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. *Crit Rev Microbiol*, 40 (3), 248-260.
- Ministry of Agriculture, Food and Fisheries (1998). *BC Agricultural Composting Handbook*. British Columbia, Canada.
- Mistry J., Finn R.D., Eddy S.R., Bateman A. et Punta M. (2013). Challenges in Homology Search: HMMER3 and Convergent Evolution of Coiled-Coil Regions. *Nucleic Acids Research*, 41:e121, 2013.
- Monard C., Gantner S. et Stenild J. (2013). Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 84, Issue 1, 1 April 2013, Pages 165–175.

Monier S., Hemery M.-L., Demoly P. et Dhivert-Donnadieu H. (2007). L'asthme professionnel aux poussières de bois Occupational asthma to wood dust. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 48, 31-34.

Nadal M, I. Inza, M. Schuhmacher, M.J Figueras, J.L. Domingo. 2009. Health Risks of the Occupational Exposure to Microbiological and Chemical Pollutants in a Municipal Waste Organic Treatment Plant. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Vol. 212, pp. 661-669

Nehmé B., Létourneau V., Foster R.J., Veillette M. et 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(3): p. 665-75.

Nehmé, B., Gilbert, Y., Létourneau, V., Forster, R.J., Veillette, M., Villemur, R. et Duchaine, C. (2009). Culture-Independent Characterization of Archaeal Biodiversity in Swine Confinement Building Bioaerosols. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75 no. 175445-5450.

Nilsson R.H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Larsson K.-H. et Ko'ljlag U. (2006). Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE*, e59 (1).

O'Brien H.E., Parrent J.L., Jackson J.A., Moncalvo J.-M. et Vilgalys R. (2005). Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5544–5550.

Park H., Park H. et Lee I. (2010). Microbial Exposure Assessment in Sawmill, Livestock Feed Industry, and Metal Working Fluids Handling Industry. *Safety Health Work*, 1, 183-191.

Pasanen A.L., Korpi A., Kasanen J.P., et Pasanen P. (1998). Microbial volatile metabolites as indoor air pollutants. *Environment International*, 24 (7), 703-712.

Peccia J., et Hernandez M. (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review. *Atmospheric environment*, 40 (21), 3941–3961.

Persoons R., Parat S., Stoklova M., Perdrix A. et Maitre A. (2010). Critical working tasks and determinants of exposure to bioaerosols and MVOC at composting facilities. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213, 338–347.

Pitkäranta M., Meklin T., Hyvärinen A., Paulin L., Auvinen P., Nevalainen A., *et al.* (2008). Analysis of Fungal Flora in Indoor Dust by Ribosomal DNA Sequence Analysis, Quantitative PCR, and Culture. *Appl Environ Microbiol*, 74 (1), 233–244.

Portnoy J.M., Kwak K., Dowling P., VanOsdol T., et Barnes C. (2005). Health effects of indoor Fungi. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 94, 313-320.

Reynolds S.J., Nonnenmann M.W., Basinas I., Davidson M., Elfman L., Gordon J., Kirychuck S., Reed S., Shenker M.B., Schlünssen V. et Sigsgaard T. (2013). Systematic Review of Respiratory Health Among Dairy Workers. *Journal of Agromedicine*, Volume 18, Issue 3, Pages 219-243.

Rittenour W.R., Ciaccio C.E., Barnes C.S., Kashon M.L., Lemons A.R., Beezhold D.H. et Green B.J. (2014). Internal transcribed spacer rRNA gene sequencing analysis of fungal diversity in Kansas City indoor environments. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16 (1), 33-43.

Rylander R. (1996). Airway Responsiveness and Chest Symptoms after Inhalation of Endotoxin or (1 →3)-β-D-Glucan. *Indoor and Built Environment*, 5, 106-111.

Rylander R. (1999). Indoor Air-Related Effects and Airborne (1-3)-P3-D-Glucan. *Environmental Health Perspectives*, 107 (3), 501-503.

Samson, R. A. (1994). Health implications of Fungi in indoor environments (Vol. 2). Indiana, USA: Elsevier science.

Sánchez-Monedero M.A., Stentiford E.I., et Urpilainen S.T. (2012). Bioaerosol Generation at Large-Scale Green Waste Composting Plants. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 55 (5), 612-618.

Schloss P.D., Westcott, S. L., Ryabin T., Hall J. R., Hartmann M., Hollister E. B., *et al.* (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (23), 7537–7541.

Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., *et al.* (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. (D. H. Janzen, Éd.) *PNAS*, 109 (16), 6241–6246.

Searl A. et Crawford J. (2012). Review of Health Risks for Workers in the Waste and Recycling Industry. Tiré de [http://www.blm-law.com/images/uploaded/news/File/Review_of_Health_Risks_for_workers_in_the_Waste_and_Recycling_Industry1%20\(2\).pdf](http://www.blm-law.com/images/uploaded/news/File/Review_of_Health_Risks_for_workers_in_the_Waste_and_Recycling_Industry1%20(2).pdf)

Seifert K.A. (2009). Progress towards DNA barcoding of Fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9 (1), 83-89.

Shade A., Hogan C.S., Klimowicz A.K., Linske M., McManus P.S. et Handelsman J. (2012). Culturing captures members of the rare biosphere. *Environmental Microbiology* (2012) 14(9), 2247–2252.

Sherf, A. F. (1987). Vegetable Diseases and Their Control. (éd. Second Edition). USA: Wiley & sons.

Simon X. et Duquenne P. (2014). Assessment of Workers' Exposure to Bioaerosols in a French Cheese Factory. *Ann. Occup. Hyg* , 1-16.

Srikanth P., Sudharsanam S. et Steinberg R. (2008). Bio-aerosols in indoor environment: Composition, health effects and analysis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 26 (4), 302-312.

Statistique Canada. (2017). Waste management industry : Business and Government Sectors, 2014. Tiré de : <http://www.statcan.gc.ca/daily-quotidien/170324/dq170324c-eng.pdf>

Swan J.R.M, Kelsey A. et Crook B. (2003). Occupational and environmental exposure to bioaerosols from composts and potential health effects - A critical review of published data. Health and Safety Laboratory. Health and Safety Executive.

Sykes P., Jones K. et Wildsmith J.D. (2007). Managing the potential public health risks from bioaerosol liberation at commercial composting sites in the UK: An analysis of the evidence base. *Resources, Conservation and Recycling*, 52 (2), 410–424.

Taha M.P.M., Pollard S.J.T., Sarkar U. et Longhurst P. (2005). Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows: Feasibility of a portable wind tunnel approach. *Waste Management*, 25, 445-450.

Tedersoo L., Anslan S., Bahram M., Põlme S., Riit T., Liiv I., Kõljalg U., Kisand V., Nilsson R.H., Hildebrand F., Bork P. et Abarenkov K. (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pairbarcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys*, 10: 1-43

Tischer C.G. et Heinrich J. (2013). Exposure assessment of residential mould, Fungi and microbial components in relation to children's health: Achievements and challenges. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216, 109-114.

Tuomi T., Johnsson T., Hemminki K., Hintikka E.L., Lindroos O., Kalso S., *et al.* (2000). Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. *Applied and environmental microbiology*, 66 (5), 1899–1904.

Viegas C., Carolino E., Sabino R., Malta-Vacas J. et Verssimo C. (2012). Fungal Contamination of Poultry Litter: A Public Health Problem. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 75 (22-23), 1341-1350.

Villeneuve J.R., Jerrett M., Brenner D., Su J., Chen H. et McLaughlin J.R. (2013). A Case-Control Study of Long-Term Exposure to Ambient Volatile Organic Compounds and Lung Cancer in Toronto, Ontario, Canada. *American Journal of Epidemiology*, 79 (4), 443-451.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., et Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, et T. J. White, eds. Academic.

World Health Organization. (2009). WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. ISBN 978 92 890 4168 3.

Wouters I.M., Spaan S., Douwes J., Doekes G. et Heederik D. (2006). Overview of Personal Occupational Exposure Levels to Inhalable Dust, Endotoxin, b(1-3)-Glucan and Fungal Extracellular Polysaccharides in the Waste Management Chain. *Ann. Occup. Hyg.*, 50 (1), 39-53.

Zekovic D.B., Kwiatkowski S., Vrvic M.M., Jakovljevic D. et Moran C.A. (2005). Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 205-230.

Zhang J., Zeng J., Chen Y., Yu M., Yu Z., Yong H.I., *et al.* (2011). Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*, 102, 2950–2956.

ANNEXE A

Tableau 1 : Solution Master-mix pour réaction d'amplification de la région ITS

Substance	Concentration	Volume
PCR-mix (IDT, Coralville, États-Unis)	5x	10 µl
MgCl ₂ (IDT, Coralville, États-Unis)	25 nM	6 µl
Taq DNA polymerase (IDT, Coralville, États-Unis)	5 µ/µl	0,5 µl
Amorce ITS1 (Promega, Madison, États-Unis)	100 µM/769 µl IDTE Buffer pH8	0,125 µl
Amorce ITS4 (Promega, Madison, États-Unis)	100 µM/1399 µl IDTE Buffer pH8	0,125 µl
dNTP (IDT, Coralville, États-Unis)	10 nM	0,5 µl
ADN	-	2 µl d'ADN pur (5 poinçons de carte FTA)
H ₂ O	-	30,75 µl

ANNEXE B

Tableau 2 : Amorces et sondes utilisées pour l'amplification des microorganismes sélectionnés

<i>Penicillium, Aspergillus</i> and <i>Paecilomyces variotii</i> http://www.epa.gov/microbes/moldtech.htm	PenAsp1mgb (Taqman) PenAspR1: 5'--GCC CGC CGA AGC AAC-- -3' PenAspF1: 5'--CGG AAG GAT CAT TAC TGA GTG-- -3' PenAspP1mgb: 5'-- -FAM--CCA ACC TCC CAC CCG TG-- - TAMRA-- -3'	Denat : 94°C -- - 3min Hybrid : 94°C -- - 15 sec Elong : 60°C -- - 60 sec Cycles : 40
---	--	--