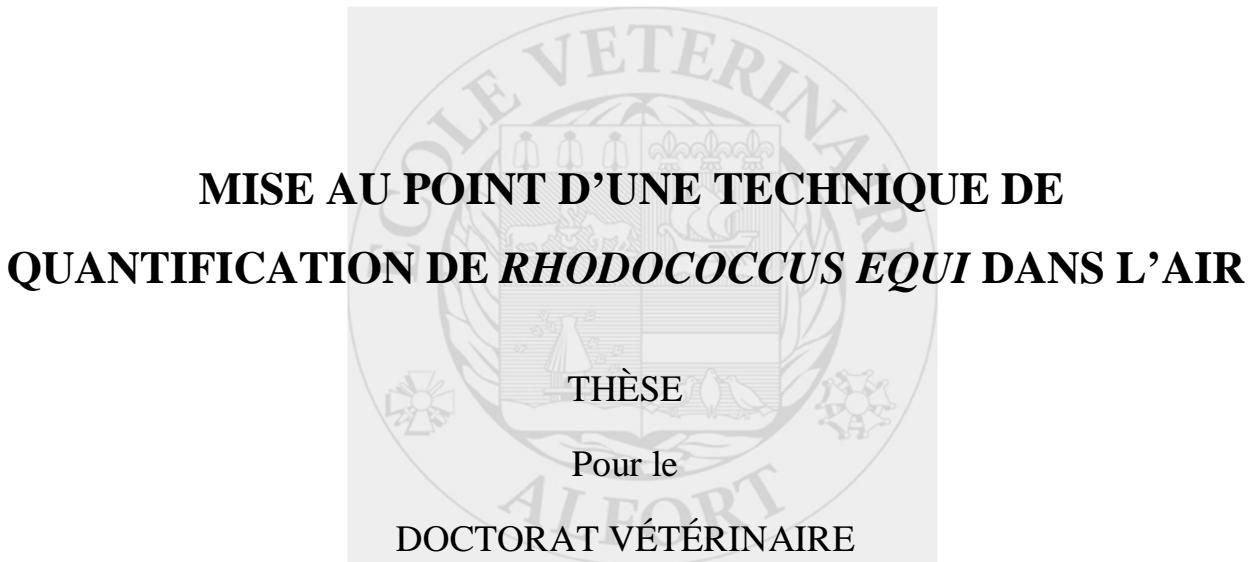


ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 2012



Présentée et soutenue publiquement devant
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le

par

Damien, Hyacinthe PHILIPOT

Né le 30 août 1986 à Flers (Orne)

JURY

**Président : Pr
Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL**

Membres

**Directeurs : Mme QUINTIN-COLONNA Françoise
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort**

**Assesseur : M ELOIT Marc
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort**

**Invitée : Mme TAPPREST Jackie
Chef de l'unité Épidémiologie et Anatomie Pathologique au Laboratoire Pathologie Équine de
l'ANSES Site de Dozulé**

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. et Mme : BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

<p>- UNITE DE CARDIOLOGIE Mme CHETBOUL Valérie, Professeur * Melle GKOUNI Vassiliki, Praticien hospitalier</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier * M. AUDIGIE Fabrice, Professeur M. DENOIX Jean-Marie, Professeur Mme CHRISTMANN Undine, Maître de conférences Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences Melle DUPAYS Anne-Gaëlle, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel</p> <p>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEDU-LEPERLIER Anne-Sophie, Maître de conférences contractuel Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p>- UNITE DE MEDECINE M. BLOT Stéphane, Professeur* M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel</p> <p>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences *</p>	<p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP)</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. MOISSONNIER Pierre, Professeur* M. FAYOLLE Pascal, Professeur M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences</p> <p>1 - UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)* M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP) M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, (rattaché au DPASP)</p> <p>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme ROUX Françoise, Maître de conférences</p>
---	--

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

<p>- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences</p> <p>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>2 - UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES Mme DUFOUR Barbara, Professeur* M. BENET Jean-Jacques, Professeur Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur Mme PRAUD Anne, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel,</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. ADJOU Karim, Maître de conférences * M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel</p> <p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. ARNE Pascal, Maître de conférences* Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Professeur</p>
--	--

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES M. CHATEAU Henry, Maître de conférences* Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p>- UNITE DE BIOCHIMIE M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE M. PHILIPS, Professeur certifié</p> <p>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur* Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences* M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel M. REYES GOMEZ Edouard, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel,</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOIS Henri-Jean, Professeur M. MAGNE Laurent, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE M. TISSIER Renaud, Maître de conférences* Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. TIRET Laurent, Maître de conférences* Mme COMBRISSON Hélène, Professeur Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences * M. ELOIT Marc, Professeur</p> <p>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences</p>
--	---

* responsable d'unité

REMERCIEMENTS

Au Professeur

De la Faculté de Médecine de Créteil,
Qui nous a fait l'hommage de présider notre jury de thèse,
Hommage respectueux.

À Madame le Professeur Quintin-Colonna,
De l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Pour toutes ces conversations et ces instants passés à refaire le monde,
Merci de m'avoir fait découvrir l'immunologie et la Corse.

À Monsieur le Professeur Eloit,
De l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Sincères remerciements pour avoir bien voulu exercer votre œil avisé.

Au Conseil Régional de Basse-Normandie, au Fond COST de l’Institut Française du Cheval et de l’Équitation et à l’ANSES qui ont tous trois soutenu financièrement ce projet,
Merci de nous avoir accordé votre confiance.

Au Docteur Jackie Tapprest,
De l’ANSES Dozulé,
Qui m’a proposé ce sujet et encadré au cours de ces travaux,
Pour sa patience, sa disponibilité et ses encouragements.

À Corinne Sévin,
Pour s’être autant investie et revenue au laboratoire tous ces samedis.
Je garde un excellent souvenir des séances de prélèvements et de nos déjeuners sur l’herbe.

À Betty Carmouët
Pour sa persévérance bretonne dans le travail.

À Edmond Roy,
Pour avoir été présent dans les moments difficiles,
Pour m’avoir initié aux tableaux croisés dynamiques.
Tous mes souhaits de réussite pour la suite de l’étude.

Au Docteur Claire Laugier,
Directrice du Laboratoire de Pathologie Équine de l’ANSES Dozulé,
Pour avoir mis à notre disposition les moyens humains et matériels nécessaires.

À Fabien Duquesne,
Pour son aide précieuse en biologie moléculaire et en informatique.

À Julien Cauchard,

Pour nous avoir fourni les ressources bibliographiques.

Au personnel de l'ANSES: Nathalie, Cécile, Pascale, Clara, les Lydia, Évelyne,

Armand, Benoît et tous les autres,

Merci pour votre accueil et votre sourire.

À Didier Huonnic et son équipe de l'ANSES Ploufragan,

Pour nous avoir consacré du temps à expliquer vos travaux et pour nous avoir gracieusement prêté les appareils pour débuter nos expériences.

Aux éleveurs des haras H1 et H2 qui ont accepté de participer à cette aventure,

À tout le personnel des haras que nous avons côtoyé.

Pour avoir porté un intérêt particulier à notre projet et nous avoir confié vos chevaux.

À la Clinique Vétérinaire de la Côte Fleurie,

Aux Docteurs Xavier D'Ablon et Julie Gatti,

Pour avoir présenté notre projet aux éleveurs et nous avoir transmis les dossiers médicaux.

À mes parents,

Pour avoir toujours été à mes côtés,

Merci à ma maman de m'avoir transmis sa combativité.

Merci à mon papa pour m'avoir donné la force d'assumer mes convictions.

À mon frère,

Pour cette originalité que nous partageons,

Que toutes nos idées et celles que nous n'avons pas encore puissent voir le jour,

Remerciements particuliers pour l'assistance informatique lors de l'écriture du manuscrit.

À Élodie, ma cigale,

Pour remplir mon cœur de soleil,

Pour son sourire et son amour,

Que notre bonheur voyage encore longtemps.

À ma famille pour m'avoir toujours encouragé à poursuivre mes études.

À la famille Philipot de Sucy-en-Brie chez qui j'ai trouvé refuge lors des périodes d'examens!

À mes grands-parents et à la Mamie trop tôt disparus,

Pour tous les plaisirs simples de la vie, histoires ou gâteaux.

À la famille Hittinger pour leurs conseils précieux et leur accueil,

À la famille Dauphin pour leur amitié et leur hospitalité.

À Nicole, pour veiller sur Kipper.

À Pépite et Misty.

À Christiane Head, Alain Jouanne et Jean-Luc Pelletan,

Pour m'avoir fait découvrir le monde des courses et connaître les joies du canter.

Aux Docteurs Le Moan, Pechayre, Galisson, Van Vlierberghe, Colin, Martin, Faroult et Cossion,

Aux autres vétérinaires que j'ai côtoyés et qui m'ont tant appris.

Au Professeur Schernberg et à Alexis Caron pour m'avoir fait entrevoir le monde de la santé humaine.

Aux années alforiennes et toutes ces incroyables péripéties vécues depuis 5 ans avec lesquels nous pourrions écrire un véritable best-seller.

À Nicolas, pour sa présence et nos éclats de rire aux coins du monde,

À Alice et Marine pour notre amitié déjantée !

Aux groupes 3 et 10, à notre trinôme Chuvesque, Cyril et Gouz, à la promotion 2011,

Pour ces instants de dur labeur et ces soirées bien méritées.

Aux fous de la promotion 2013,

À mon ancienne Bérénice et à nos anciens sobres et classes,

À mon poulot et aux Sulnix moins sobres et moins classes,

Rendez-vous en 2013.

À la clinique équine et particulièrement au Docteur Sophie Pradier,

Au Professeur Parodi, pour son écoute et son dynamisme,

Aux docteurs Perrot et Desquibet pour leur sympathie,

À Madame Colmin, pour sa patience devant mes nombreuses conventions de stage,

Au personnel de la bibliothèque, de la scolarité et du restaurant universitaire,

À Madame Siky Savane, personnage haut en couleur de la résidence universitaire.

À Ginette et son groupuscule glauque, les Lagranges,
À Axelle, Hélène, Isaure, Benoît et Rafaël, à nos soirées poivrées,
Aux autres BJiens de cette formidable prison dorée, Pierre-Adrien, Flore et Henri,
À Mesdames Aubagnac et Lombard, amateurs de foie gras et d'opéra,
À toutes nos Khôlles riche en émotions !

À Barcelone et à cette année Erasmus qui a réservé tant de découvertes
À tous les indigènes qui ont su me faire apprécier le catalan : Esteve, Núria, Marta.

À l'Institut et nos années lycées et notre insouciance,
À Armelle, Lucie, Cynthia, Pierre, Julien, Emmanuel, Maxime, Mathilde,
Souvenirs impérissables.
Aux splices, à Mathilde et à Hamza pour être aussi épicés !

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	14
LISTES DES ANNEXES	18
LISTE DES ABRÉVIATIONS	20
LISTE DES UNITÉS DE MESURE	23
INTRODUCTION.....	25
1 ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	27
1.1 GÉNÉRALITÉS SUR <i>RHODOCOCCUS EQUI</i>	27
1.1.1 Caractères généraux.....	27
1.1.2 Facteurs de virulence	29
1.1.2.1 <i>Paroi cellulaire</i>	29
1.1.2.2 <i>L'equi factor</i>	29
1.1.2.3 <i>Plasmides</i>	29
1.1.3 Expression du plasmide de virulence in vitro et mise en culture de <i>Rhodococcus equi</i>	30
1.1.3.1 <i>Température, pH, stress oxydatif</i>	30
1.1.3.2 <i>Teneur en oligo-éléments de l'environnement</i>	30
1.1.3.3 <i>Milieux de culture et besoins nutritifs</i>	30
1.2 GÉNÉRALITÉS SUR LA RHODOCOCOSE.....	31
1.2.1 Symptomatologie	31
1.2.1.1 <i>Formes cliniques chez les équidés</i>	31
1.2.1.1.1 Forme respiratoire.....	31
1.2.1.1.2 Autres formes.....	31
1.2.1.2 <i>La rhodococcose chez les autres espèces</i>	32
1.2.2 Épidémiologie	33
1.2.3 Conséquences économiques.....	33

1.2.4	Pathogénie de l'infection.....	33
1.2.4.1	<i>Mode de contamination.....</i>	33
1.2.4.2	<i>Modalités de l'infection</i>	33
1.2.4.3	<i>Sensibilité du poulain et mécanismes de protection.....</i>	34
1.2.5	Lésions observées	35
1.2.6	Moyens diagnostiques	36
1.2.7	Traitements.....	36
1.3	LES MÉTHODES DE QUANTIFICATION DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i>	36
1.3.1	Technique de mise en culture.....	36
1.3.2	Quantification dans le sol.....	37
1.3.3	Quantification dans les fèces.....	37
1.3.4	Quantification dans l'air.....	38
1.4	FACTEURS DE RISQUES DE LA RHODOCOCOSE ET PRÉVENTION.....	38
1.4.1	Charge en <i>Rhodococcus equi</i> dans le sol et dans l'air.....	38
1.4.2	Facteurs de risque liés à la structure et aux pratiques d'élevage	40
2	RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT	41
2.1	REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE LIEUX CONTAMINÉS.....	41
2.1.1	Les lieux	41
2.1.1.1	<i>Les parcelles, milieu extérieur.....</i>	41
2.1.1.2	<i>Le box, milieu confiné</i>	43
2.1.2	Protocole de contamination.....	43
2.1.3	Vérifications périodiques de la persistance de la contamination.....	45
2.2	RELEVÉ DES CONDITIONS MÉTÉOROLOGIQUES.....	46
2.2.1	Les paramètres météorologiques étudiés dans la bibliographie.....	46
2.2.2	Les paramètres relevés avec la première station météorologique.....	46
2.2.3	Les paramètres relevés avec la deuxième station météorologique	47
2.3	PRÉLÈVEMENTS D'AIR	48

2.3.1	<i>Quantification de Rhodococcus equi</i>	48
2.3.1.1	<i>Présentation du CIP, de l'Air idéal®3P et de la pompe DELUXE</i>	48
2.3.1.1.1	<i>L'Air idéal®3P</i>	48
2.3.1.1.1.1	<i>Caractéristiques</i>	48
2.3.1.1.1.2	<i>Mode de fonctionnement</i>	49
2.3.1.1.1.3	<i>Mise en culture du prélèvement et analyse</i>	51
2.3.1.1.2	<i>La pompe DELUXE 224-PCMTX8</i>	51
2.3.1.1.2.1	<i>Caractéristiques</i>	51
2.3.1.1.2.2	<i>Mode de fonctionnement</i>	52
2.3.1.1.2.3	<i>Mise en culture du prélèvement et analyse</i>	52
2.3.1.1.3	<i>Le capteur individuel de particules CIP 10 M</i>	53
2.3.1.1.3.1	<i>Caractéristiques</i>	53
2.3.1.1.3.2	<i>Mode de fonctionnement</i>	54
2.3.1.1.3.3	<i>Mise en culture du prélèvement et analyse</i>	57
2.3.1.2	<i>Étude de sélection d'un appareil</i>	58
2.3.1.2.1	<i>Étude comparative du CIP 10MR et de l'Air idéal®3P</i>	58
2.3.1.2.1.1	<i>En extérieur</i>	58
2.3.1.2.1.2	<i>En intérieur, en box confiné</i>	64
2.3.1.2.1.2.1	Sans agitation de la paille	64
2.3.1.2.1.2.2	Avec agitation de la paille	66
2.3.1.2.2	<i>Essais complémentaires avec la pompe DELUXE</i>	68
2.3.1.2.2.1	<i>En extérieur</i>	68
2.3.1.2.2.2	<i>En intérieur, en box confiné</i>	70
2.3.1.2.2.2.1	Sans agitation de la paille	70
2.3.1.2.2.2.2	Avec agitation de la paille	71
2.3.1.3	<i>Comparaison synthétique des appareils et choix de l'un d'entre eux</i>	73
2.3.1.4	<i>Étude des concentrations en Rhodococcus equi dans l'air selon la fraction prélevée</i>	78
2.3.1.4.1	<i>En milieu confiné</i>	78
2.3.1.4.2	<i>En extérieur, sur la parcelle en terre</i>	80
2.3.1.5	<i>Une mesure avec des appareils embarqués révélatrice de l'exposition réelle</i>	81
2.3.1.5.1	<i>Enseignements des résultats</i>	81
2.3.1.5.2	<i>Intérêt de la mise en place d'un baudrier</i>	82
2.3.1.5.3	<i>Cahier des charges et conception</i>	83
2.3.1.6	<i>Premier essai à l'ANSES</i>	84
2.3.1.6.1	<i>Matériel retenu</i>	84
2.3.1.6.2	<i>Protocole retenu</i>	85
2.3.1.6.3	<i>Résultats obtenus</i>	86
2.3.1.7	<i>Validation du protocole dans deux haras</i>	87
2.3.1.7.1	<i>Choix du haras</i>	87
2.3.1.7.2	<i>Choix des surfaces</i>	88
2.3.1.7.3	<i>Choix du porteur du CIP</i>	88
2.3.1.7.4	<i>Résultats, discussion et enseignements</i>	89
2.3.2	<i>Quantification des poussières dans l'air</i>	90

2.3.2.1	<i>Présentation de la technique</i>	91
2.3.2.1.1	Mode de fonctionnement.....	91
2.3.2.1.2	Protocole de pesée et préparation des mousses	92
2.3.2.2	<i>Quantification des fractions alvéolaires et totales pour différents temps de collecte</i> 95.....	93
2.3.2.3	<i>Perfectionnement du protocole</i>	95
2.3.2.4	<i>Premier essai à l'ANSES</i>	97
2.3.2.4.1	Matériel retenu	97
2.3.2.4.2	Protocole retenu	97
2.3.2.4.3	Résultats obtenus	100
2.3.2.5	<i>Validation du protocole dans deux haras</i>	100
2.3.2.5.1	Choix du haras	100
2.3.2.5.2	Choix des surfaces	101
2.3.2.5.3	Choix du porteur du CIP	101
2.3.2.5.4	Résultats obtenus	102
2.3.2.5.5	Problèmes rencontrés	102
2.3.2.5.6	Choix de quantification des poussières totales	103
2.4	PRÉLÈVEMENTS DE TERRE	106
2.4.1	Choix des profondeurs de prélèvement.....	106
2.4.2	Choix de la tarière.....	107
2.4.3	Protocole.....	107
2.4.4	Résultats obtenus sur les parcelles.....	110
2.5.1	Utilisation d'un protocole interne	111
2.5.2	Résultats obtenus avec une souche virulente de référence.....	114
3	ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	115
3.1	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	115
3.2	MATÉRIEL	116
3.2.1	Critères de sélection des haras	116
3.2.2	Présentation des haras retenus.....	116
3.2.3	Choix des différentes surfaces	117
3.3	MÉTHODE	122
3.3.1	Organisation de l'étude.....	122

3.3.2	Protocoles retenus	123
3.3.2.1	<i>Relevé des conditions climatiques et des conditions de terrain</i>	123
3.3.2.2	<i>Quantification de Rhodococcus equi en aérosols dans l'air alvéolaire et total</i>	123
3.3.2.3	<i>Quantification des poussières totales en aérosols</i>	125
3.3.2.4	<i>Quantification de Rhodococcus equi dans les sols</i>	125
3.3.2.5	<i>Recherche de Rhodococcus equi au sol grâce aux lingettes</i>	128
3.3.2.6	<i>Quantification de Rhodococcus equi dans les fèces.....</i>	128
3.3.3	Organisation d'une séance de prélèvement.....	129
3.3.3.1	<i>Opérations préliminaires.....</i>	129
3.3.3.2	<i>Préparation des mousses rotatives et détermination de leurs masses.....</i>	129
3.3.3.3	<i>Présentation d'une journée type de prélèvement</i>	130
3.3.3.4	<i>Opérations de retour au laboratoire.....</i>	131
3.3.3.5	<i>Analyses des prélèvements au laboratoire.....</i>	131
3.3.3.5.1	<i>Analyse bactériologiques des prélèvements</i>	131
3.3.3.5.1.1	<i>Mise en culture des prélèvements de terre ou de fèces.....</i>	131
3.3.3.5.1.2	<i>Mise en culture des prélèvements effectués avec les lingettes.....</i>	132
3.3.3.5.1.3	<i>Mise en culture des prélèvements d'air</i>	133
3.3.3.5.2	<i>Analyse de la virulence de Rhodococcus equi par Polymerase Chain Reaction</i>	133
3.3.3.6	<i>Détermination de la concentration massique en aérosols.....</i>	134
3.3.3.7	<i>Constitution d'une souchothèque</i>	134
3.3.4	Mode de collecte des informations sur les chevaux	135
3.3.4.1	<i>Identité des chevaux</i>	135
3.3.4.2	<i>Renseignements médicaux</i>	135
3.3.5	Méthode de traitement des données collectées	135
3.3.5.1	<i>Résultats obtenus.....</i>	135
3.3.5.2	<i>Exploitation des résultats et outils statistiques</i>	136
3.4	OBSERVATIONS	136
3.5	RÉSULTATS ET DISCUSSION	137
3.5.1	Analyse descriptive des données générales des haras	137
3.5.2	Analyse des données provenant des prélèvements de fèces.....	141
3.5.3	Analyse des données provenant des prélèvements de terre	145
3.5.3.1	<i>Comparaison entre les deux haras.....</i>	145
3.5.3.2	<i>Comparaison selon la profondeur du prélèvement</i>	149
3.5.3.3	<i>Comparaison selon la surface</i>	152
3.5.3.4	<i>Comparaison selon la localisation.....</i>	158
3.5.3.5	<i>Comparaison selon le temps.....</i>	163

3.5.4	Analyse des données provenant des autres prélèvements réalisés au sol.....	165
3.5.5	Analyse des données provenant des concentrations pondérales de poussières dans l'air.....	166
3.5.6	Analyse des concentrations en <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air	170
3.5.6.1	<i>Comparaison selon le type de haras</i>	170
3.5.6.2	<i>Comparaison selon le type de surface</i>	172
3.5.6.3	<i>Évolution au cours du temps</i>	174
3.5.6.4	<i>Comparaison selon la fraction de l'air</i>	175
3.5.7	Étude de la relation entre la concentration en <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air et certains paramètres climatiques ou de terrain	177
3.5.8	Étude de la relation entre la concentration de poussières en aérosols et la concentration en <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air	178
3.5.9	Étude de la relation entre la concentration en <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air et la concentration de <i>Rhodococcus equi</i> dans le sol aux faibles profondeurs.....	181
3.6	EXPÉRIENCE COMPLÉMENTAIRE.....	183
3.7	DISCUSSION	185
3.8	PERSPECTIVES.....	189
	CONCLUSION	191
	ANNEXES	193
	BILIOGRAPHIES	220

Liste des figures

Figure n° 1: Schéma présentant le principe de fonctionnement par impaction	49
Figure n° 2: Schéma présentant le principe de fonctionnement de la coupelle rotative du CIP 10M (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO)	54
Figure n° 3: Schéma présentant la répartition des particules de la fraction alvéolaire selon leur taille. (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO, page 8) Le pourcentage de pénétration traduit la probabilité de retrouver une particule d'un diamètre donnée au sein des alvéoles pulmonaires.....	54
Figure n° 4: Schéma des éléments composant la tête alvéolaire d'un CIP (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO page 8)	56
Figure n° 5: Schéma présentant trajet de l'air dans le CIP 10 R (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO page 8).....	56
Figure n° 6: Schéma du CIP 10 en coupe longitudinale. Présentation de la nomenclature et du trajet suivi par l'air et ses aérosols	90
Figure n° 7: Agrandissement de la zone où se loge la coupelle de plastique. Détail du trajet de l'air et des aérosols	91
Figure n° 8: Résultats du test t de Student, illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent le numéro du jour de naissance de l'année 2011. Boîte à moustaches autour de la moyenne.....	140
Figure n° 9: Résultats du test de Mann-Withney, illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent le numéro du jour de naissance de l'année 2011. Boîte à moustaches autour de la moyenne.....	141
Figure n° 10: Répartition du portage de <i>Rhodococcus equi</i> chez les 21 juments suitées du haras H2	142
Figure n° 11: Répartition du portage de <i>Rhodococcus equi</i> chez les 21 poulains du haras H2... 142	142
Figure n° 12: Nombre de fois où <i>Rhodococcus equi</i> virulent et non virulent a été isolé selon chaque haras. Les souches virulentes sont représentées en rouge.	146
Figure n° 13: Concentrations cumulées en <i>Rhodococcus equi</i> , virulent et non virulent, selon chaque haras	148
Figure n° 14: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents (UFC/g) selon la profondeur. Données cumulées pour les deux haras.	150

Figure n° 15: Nombre de fois où <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents ont été isolés selon la surface pour les deux haras	152
Figure n° 16: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents selon la profondeur pour chaque surface dans le haras H1	157
Figure n° 17: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents selon la profondeur pour chaque surface dans le haras H2	157
Figure n° 18: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans le paddock du haras H1 selon la localisation du prélèvement (auge, entrée, centre) et sa profondeur...	160
Figure n° 19: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans le champ du haras H1 selon la localisation du prélèvement (auge, entrée, centre) et sa profondeur...	160
Figure n° 20: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans le paddock du haras H2 selon la localisation du prélèvement (auge, entrée, centre) et sa profondeur...	162
Figure n° 21: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans le champ du haras H2 selon la localisation du prélèvement (auge, entrée, centre) et sa profondeur...	162
Figure n° 22: Évolution des concentrations en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents en fonction du temps. Il y a 6 séances consécutives. Les valeurs des concentrations en <i>Rhodococcus equi</i> sont représentées au-dessus de l'axe horizontal central pour H1 et en-dessous de cet axe pour H2.....	164
Figure n° 23: Concentrations pondérales en aérosols de l'air total (en g/ m ³ d'air) cumulées sur 4 séances de prélèvements selon chaque type de surface et haras	166
Figure n° 24: Résultats du test Mann-Whitney. Illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent a concentration pondérale de poussières en g/m ³ d'air.....	167
Figure n° 25: Résultats du test Mann-Whitney. Illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent la concentration pondérale de poussières en g/m ³ d'air.....	168
Figure n° 26: Concentration pondérale en aérosols dans l'air total en fonction du numéro de la séance, de la surface étudiée et du haras. Les histogrammes au-dessus de l'axe horizontal central représentent les valeurs obtenues pour le haras H1 et ceux en-dessous, les valeurs du haras H2.....	169
Figure n° 27: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans l'air total selon chaque haras. Données cumulées pour les séances 3 à 6	170
Figure n° 28: Concentrations cumulées en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans l'air total selon chaque surface et chaque haras. Données cumulées pour les séances 3 à 6	172

Figure n° 29: : Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans l'air total en fonction du numéro de séance pour le haras H1. En ordonnées vers le haut sont représentées les valeurs pour le paddock tandis que celles pour le champ sont représentées vers le bas.....	174
Figure n° 30: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans l'air total en fonction du numéro de séance pour le haras H2. En ordonnées vers le haut sont représentées les valeurs pour le paddock tandis que celles pour le champ sont représentées vers le bas.....	175
Figure n° 31: Concentrations cumulées en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents selon que le l'échantillonnage est réalisé dans l'air total ou bien sa fraction alvéolaire.....	176
Figure n° 32: Résultats graphiques du test de corrélation de Spearman pour l'étude de la corrélation entre concentrations pondérales en aérosols et concentration en <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air dans le haras H1	179
Figure n° 33: Résultats graphiques du test de corrélation de Spearman pour l'étude de la corrélation entre concentrations pondérales en aérosols et concentration en <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air dans le haras H2	180
Figure n° 34: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans la portion superficielle du sol (surface et 5 cm) au cours du temps pour le haras H1. Les valeurs mesurées dans le paddock sont représentées en ordonnées vers le haut, celles du champ vers le bas.....	182
Figure n° 35: Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents dans la portion superficielle du sol (surface et 5 cm) au cours du temps pour le haras H2. Les valeurs mesurées dans le paddock sont représentées en ordonnées vers le haut, celles du champ vers le bas.....	182
Figure n° 36: Comparaison entre les performances du CIP 10 I et la courbe inhalable théorique. Fraction d'aérosols pénétrant en fonction du diamètre aérodynamique de la particule	185
Figure n° 37: Vue en coupe longitudinale de la tête du CIP 10 I. Dessin technique fourni par ARELCO	186

Liste des tableaux

Tableau n° 1: Correspondance entre les volumes d'air prélevés et les temps de collecte respectifs à chaque appareil	59
Tableau n° 2: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps	60
Tableau n° 3: Nombre colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (en UFC) comptées sur chaque gélose à l'issue des lectures quotidiennes durant 72 heures en fonction du type d'appareil utilisé, du volume d'air collecté et de la hauteur de prélèvement.....	61
Tableau n° 4: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps lors de leur utilisation dans le box sans agitation de la paille	64
Tableau n° 5: Nombre colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (en UFC) comptées sur chaque gélose selon le type d'appareil, le volume d'air collecté et la hauteur de prélèvement.....	65
Tableau n° 6: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps lors de leur utilisation dans le box avec agitation de la paille.....	67
Tableau n° 7: Nombre colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (en UFC) comptées sur chaque gélose selon le type d'appareil, le volume d'air collecté et la hauteur de prélèvement.....	67
Tableau n° 8: Nombre de colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (UFC) comptées sur les géloses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicata.....	69
Tableau n° 9: Nombre de colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (UFC) comptées sur les géloses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicata.....	70
Tableau n° 10: Nombre de colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (UFC) comptées sur les géoses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicata.....	71
Tableau n° 11: Confrontation des appareils étudiés selon les points qui ont retenu notre attention	74
Tableau n° 12: Tableau présentant le nombre de colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (UFC) comptées sur les boîtes de gélose après 72 heures de culture selon la fraction recueillie et le numéro du triplicata	79
Tableau n° 13: Nombre de colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (UFC) comptées sur les boîtes de gélose selon la fraction recueillie et le numéro du triplicata	80
Tableau n° 14: Colonies de <i>Rhodococcus equi</i> dénombrées en fonction de la hauteur de prélèvement et du volume d'air collecté.....	81

Tableau n° 15: Tableau présentant le nombre de colonies de <i>Rhodococcus equi</i> comptabilisées sur boîte de gélose ANC après 72 heures de culture selon le numéro du triplicata et la dilution effectuée.....	87
Tableau n° 16: Masse (g) des mousses rotatives avant ou après le prélèvement en fonction de la fraction de l'air sélectionnée et du temps de collecte (min). ΔM est la différence de masse entre la masse finale après prélèvement et la masse initiale	94
Tableau n° 17: Masses des coupelles mesurées avant prélèvement.....	98
Tableau n° 18: masses des coupelles mesurées avant prélèvement	100
Tableau n° 19: Concentrations massiques en aérosols en fonction de chaque haras, des surfaces et des dates de prélèvement	102
Tableau n° 20: Masses des différentes coupelles avant et après prélèvement. ΔM est la différence calculée entre la masse de la coupelle après prélèvement et stabilisation hygroscopique et la masse de la coupelle initiale	105
Tableau n° 21: Nombre de colonies de <i>Rhodococcus equi</i> comptées sur les boîtes de gélose en fonction de la profondeur de prélèvement, du type de parcelle et de la proximité avec le crottin initialement contaminé.....	110
Tableau n° 22: Surfaces et densités pour chaque haras	138
Tableau n° 23: Répartition des effectifs selon chaque haras (RES : Résidentes ; EXT :Extérieures)	139
Tableau n° 24: Dates de naissances des poulains du haras H2. Les 5 poulains atteints de rhodococcose sont surlignés en orange	140
Tableau n° 25: Nombre d'individus porteurs de <i>Rhodococcus equi</i> , virulent ou non virulent, au sein des classes de poulains sains et malades.....	143
Tableau n° 26: Nombre d'individus porteurs de <i>Rhodococcus equi</i> virulent au sein des classes de poulains sains et malades.....	143
Tableau n° 27: Dates du diagnostic de rhodococcose et dates des prélèvements de fèces chez les poulains atteints. Pour les poulains H2-P13 et H2-P19, le diagnostic de rhodococcose a été établi après la date de prélèvement des fèces	144
Tableau n° 28: Nombre d'individus porteur de <i>Rhodococcus equi</i> , virulent ou total, chez juments mères des poulains sains ou malades	144
Tableau n° 29: Nombre de fois où <i>Rhodococcus equi</i> virulent (P+) et non virulent (P-) a été isolé selon chaque haras.....	146

Tableau n° 30: Nombre de prélèvements où <i>Rhodococcus equi</i> a été isolé ou non selon chaque haras	147
Tableau n° 31: Nombre de prélèvements où <i>Rhodococcus equi</i> virulent a été isolé ou non selon chaque haras.....	147
Tableau n° 32: Concentrations cumulées en <i>Rhodococcus equi</i> , virulent et non virulent, selon chaque haras.....	148
Tableau n° 33: Concentration moyenne par prélèvement en <i>Rhodococcus equi</i> , virulent et non virulent, selon chaque haras	149
Tableau n° 34: Nombre de prélèvements où <i>Rhodococcus equi</i> , virulent et non virulent, selon les niveaux de prélèvements superficiels (surface et 5 cm) et les niveaux de prélèvements profonds (20 cm et 50 cm). Un prélèvement contenant des <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents n'est comptabilisé qu'une seule fois.....	150
Tableau n° 35: Nombre de prélèvements où <i>Rhodococcus equi</i> virulent a été mis en évidence selon les niveaux de prélèvements superficiels (surface et 5 cm) et les niveaux de prélèvements profonds (20 cm et 50 cm)	151
Tableau n° 36: Nombre de fois où <i>Rhodococcus equi</i> virulents et non virulents ont été isolés selon la surface pour les deux haras. Données chiffrées.	153
Tableau n° 37: Nombre de prélèvements mettant en évidence <i>Rhodococcus equi</i> , virulent ou non, selon chaque surface. Les données des deux haras sont cumulées.....	153
Tableau n° 38: Nombre de prélèvements mettant en évidence <i>Rhodococcus equi</i> virulent selon chaque surface. Les données des deux haras sont cumulées.	153
Tableau n° 39: Nombre de prélèvements mettant en évidence <i>Rhodococcus equi</i> , virulent ou non, selon chaque surface pour le haras H1	154
Tableau n° 40: Nombre de prélèvements mettant en évidence <i>Rhodococcus equi</i> virulent selon chaque surface.....	154
Tableau n° 41: Nombre de prélèvements mettant en évidence <i>Rhodococcus equi</i> , virulent ou non, selon chaque surface pour le haras H2.....	154
Tableau n° 42: Nombre de prélèvements mettant en évidence <i>Rhodococcus equi</i> virulent selon chaque surface pour le haras H2	155
Tableau n° 43: Nombre de prélèvements en surface et à 5 cm mettant en évidence <i>Rhodococcus equi</i> virulent selon chaque surface pour le haras H1	155
Tableau n° 44: Nombre de prélèvements en surface et à 5 cm mettant en évidence <i>Rhodococcus equi</i> virulent selon chaque surface pour le haras H2	155

Tableau n° 45: Concentrations moyennes en <i>Rhodococcus equi</i> virulent et non virulent dans le sol de chaque surface	156
Tableau n° 46: Nombre de prélèvements isolant <i>Rhodococcus equi</i> , virulent ou non, selon les localisations au sein des deux surfaces. Les données sont cumulées pour les deux haras.....	158
Tableau n° 47 : Nombre de prélèvements isolant <i>Rhodococcus equi</i> virulent selon les localisations au sein des deux surfaces. Les données sont cumulées pour les deux haras..	158
Tableau n° 48: Nombre de prélèvements isolant <i>Rhodococcus equi</i> virulent à une faible profondeur dans le paddock du haras H1 selon deux classes de localisation	159
Tableau n° 49: Nombre de prélèvements isolant <i>Rhodococcus equi</i> virulent à une faible profondeur dans le champ du haras H1 selon deux classes de localisation.....	159
Tableau n° 50: : Nombre de prélèvements isolant <i>Rhodococcus equi</i> virulent à une faible profondeur dans le paddock du haras H2 selon deux classes de localisation	161
Tableau n° 51: Nombre de prélèvements isolant <i>Rhodococcus equi</i> virulent à une faible profondeur dans le champ du haras H2 selon deux classes de localisation.....	161
Tableau n° 52: Nombre de prélèvements où <i>Rhodococcus equi</i> virulent ou non a été mis en évidence dans l'air total	171
Tableau n° 53: Nombre de prélèvements où <i>Rhodococcus equi</i> virulent a été mis en évidence dans l'air	171
Tableau n° 54: Nombre de prélèvements où <i>Rhodococcus equi</i> , virulent ou non, a été mis en évidence dans l'air total selon chaque surface	173
Tableau n° 55: Nombre de prélèvements où <i>Rhodococcus equi</i> virulent a été mis en évidence dans l'air total selon chaque surface	173
Tableau n° 56: Nombre de fois où <i>Rhodococcus equi</i> , virulent ou non, a été isolé dans l'air selon la fraction de l'air mesurée	176
Tableau n° 57: Nombre de fois où <i>Rhodococcus equi</i> virulent a été isolé dans l'air selon la fraction de l'air mesurée	177

Liste des photographies

Photographie n° 1: Colonies de <i>Rhodococcus equi</i> en culture sur une boîte Columbia à l'Acide Nalidixique et à la Colimycine (ANC)	28
Photographie n° 2: Coloration de GRAM d'un frottis de <i>Rhodococcus equi</i>	28
Photographie n° 3: Forme pulmonaire. Autopsie d'un poulain au laboratoire de pathologie équine.....	35
Photographie n° 4: Forme intestinale. Autopsie d'un poulain au laboratoire de pathologie équine.....	35
Photographie n° 5: Du côté sud du bâtiment de l'unité de l'ÉAP, les deux parcelles contaminées par <i>Rhodococcus equi</i> . Au sud, côté est, la parcelle contaminée en herbe	42
Photographie n° 6: Au sud, côté ouest, la parcelle contaminée en terre	42
Photographie n° 7: Les box vus de l'extérieur.....	43
Photographie n° 8: Le box paillé contaminé.....	43
Photographie n° 9: La centrale OREGON SCIENTIFIC ®	46
Photographie n° 10: Les sondes fixées sur la potence.....	47
Photographie n° 11: La sonde CONRAD®	47
Photographie n° 12: Présentation de l'Air idéal®3P. Vue de la face avant montrant l'orifice d'aspiration, les lamelles de fixation et le capot de prélèvement.....	50
Photographie n° 13: Vue rapprochée du crible, échelle 1 :3	50
Photographie n° 14: La pompe DELUXE, son tuyau, son porte cassette et ses cassettes de prélèvement.....	51
Photographie n° 15: Le CIP 10 M et sa coupelle métallique ainsi que les différents étages de la tête alvéolaire	54
Photographie n° 16: Prélèvement du BHI contenant les bioaérosols. Cette étape se réalise sous le poste de sécurité microbiologique	58
Photographie n° 17: Les prélèvements en cours. L'Air idéal®3P collectant l'air à 15 cm du sol et les deux CIP 10 MR, l'un posé au sol et l'autre fixé sur la potence à 1,15 m de hauteur ..	60
Photographie n° 18: Fermeture du crible de l'Air idéal®3P avant le prélèvement à la hauteur de 15 cm.....	60

Photographie n° 19: Résultats obtenus avec le CIP 10 MR après 72 heures de culture pour les 3 volumes collectés	62
Photographie n° 20: Résultats obtenus avec l'Air idéal®3P après 72 heures de culture pour les 3 volumes collectés	62
Photographie n° 21: Mise en culture de la solution BHI après la phase de prélèvement. Cette image montre l'intérêt des dilutions successives puisque même à la dilution 10^{-1} , la gélose contient encore de très nombreuses colonies.	63
Photographie n° 22: La potence est installée au centre du box fermé avec les sondes avant le début des prélèvements.....	64
Photographie n° 23: Comparaison des résultats obtenus avec l'air idéal®3P et le CIP 10 MR pour un prélèvement de 600 litres à 15 centimètres du sol après 72 heures d'incubation. La gélose correspondant au CIP 10 MR est à la dilution 10^0	66
Photographie n° 24: Quelques colonies de staphylocoques obtenues après 72 h de culture. La photographie montre le duplicata n°1 à la dilution 10^0	71
Photographie n° 25: Colonies obtenues après 72 heures de culture sur boîte de gélose ANC. Boîte à la dilution 10^0	72
Photographie n° 26: Colonies obtenues après 72 heures de culture sur boîte de gélose ANC. Boîte à la dilution 10^{-1}	72
Photographie n° 27: Le Rhodopopus après sa confection. Une boucle de plastique permet d'ajuster les lanières au plus près du CIP	83
Photographie n° 28: Le CIP 10 MR installé dans le Rhodopopus. Il est ensuite fixé au licol par des lanières en cuir attachées dans les passants	83
Photographie n° 29: Le montage de la tête alvéolaire sous le poste de sécurité microbiologique	85
Photographie n° 30: De retour au laboratoire, dépôts sur boîtes de gélose ANC et réalisation de triplicatas	86
Photographie n° 31: Opaline, premier cheval à avoir testé l'appareil. À sa gauche, la position initialement prévue pour le CIP 10 MR. À sa droite, la position finalement adoptée	86
Photographie n° 32: CIP portés par la jument dans le champ du haras H2. Le poulain reste le plus souvent à proximité de sa mère	89
Photographie n° 33: La balance de précision utilisée, fermée par des vitres.....	92

Photographie n° 34: Le CIP 10 dans sa version capable de collecter les poussières totales de l'air. Seuls le carter et une buse sont fixés au dessus de la coupelle de prélèvement	93
Photographie n° 35: L'étuve destinée exclusivement à la préparation des mousses	98
Photographie n° 36: La manipulation des mousses ne s'effectue qu'avec des gants en nitrile et une pince	98
Photographie n° 37: Installation de la coupelle et de la mousse sous le poste de sécurité microbiologique	99
Photographie n° 38: Le CIP 10 R est situé à gauche, le CIP 10 MR est fixé à droite de la jument	101
Photographie n° 39: La tarière Edelman utilisée pour les prélèvements de terre	109
Photographie n° 40: La portion de la terre, située au milieu du tourne à gauche, est poussée dans un pilulier avec des gants à usage unique	109
Photographie n° 41: Résultats de la PCR après révélation par la Gbox	114
Photographie n° 42: Vues aériennes du haras H1 présentant les différents sites de prélèvements	118
Photographie n° 43: Prélèvement dans le box du haras H1	118
Photographie n° 44: Prélèvement dans le paddock du haras H1	119
Photographie n° 45: Prélèvement dans le champ du haras H1	119
Photographie n° 46 : Vues aériennes du haras H2 présentant les différents sites de prélèvements	120
Photographie n° 47: Prélèvement dans le box du haras H2	120
Photographie n° 48: Prélèvement dans le paddock du haras H2	121
Photographie n° 49: Prélèvement dans le champ du haras H2	121
Photographie n° 50: Conditionnement des coupelles de prélèvement et prépartion des CIP pour prélèvements suivants dans le coffre de la voiture.....	124
Photographie n° 51: Sites de fixation des CIP sur la tête de la jument. A sa droite le CIP 10 MR. A sa gauche, le CIP 10 latéralement et le CIP 10 M médialement	124
Photographie n° 52: Site de prélèvement du sol à l'entrée du paddock du haras H1.....	126
Photographie n° 53: Site de prélèvement du sol à l'auge du paddock du haras H1	126

Photographie n° 54: Site de prélèvement du sol au centre du paddock du haras H1	126
Photographie n° 55: Site de prélèvement du sol à l'entrée du champ du haras H1	126
Photographie n° 56: Site de prélèvement du sol à l'auge du champ du haras H1	126
Photographie n° 57: Site de prélèvement du sol au centre du champ du haras H1	126
Photographie n° 58: Site de prélèvement du sol à l'entrée du paddock du haras H2	127
Photographie n° 59: Site de prélèvement du sol à l'auge du paddock du haras H2	127
Photographie n° 60: Site de prélèvement du sol au centre du paddock du haras H2.....	127
Photographie n° 61: Site de prélèvement du sol à l'entrée du champ du haras H2	127
Photographie n° 62: Site de prélèvement du sol à l'auge du champ du haras H2	127
Photographie n° 63: Site de prélèvement du sol au centre du champ du haras H2.....	127
Photographie n° 64: Réalisation d'un prélèvement avec une lingette sur une allée fréquentée par les poulains du haras H2	128
Photographie n° 65: Mesure de la concentration en <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air total dans le box d'un poulain porteur de <i>Rhodococcus equi</i> virulent.	183
Photographie n° 66: La jument est tenue pendant l'opération de curage du box.....	183
Photographie n° 67: Cultures bactériologiques après une semaine pour le box du poulain porteur à gauche et celui du poulain malade à droite	184

Listes des annexes

Annexe n° 1: Composition du milieu Brain Heart Infusion (Bouillon cœur-cervelle)	193
Annexe n° 2: Composition de la gélose ANC columbia avec 5% de sang de mouton, milieu sélectif des bactéries gram positives.	193
Annexe n° 3: Loi de Feller (extrait du manuel d'utilisation de l'Air idéal® 3P page 7-2).....	194
Annexe n° 4: Composition de l' Argospray®.....	194
Annexe n° 5: Dénombrement des colonies (extrait de la norme NF EN 13098 :2000-12).....	195
Annexe n° 6: Modèle du formulaire utilisé pour noter les résultat pour chaque prélèvement. Données pour le haras H2 le 19/05/2011.....	196
Annexe n° 7: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour la quantification des aérosols dans le haras H1.....	201
Annexe n° 8: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour la quantification des aérosols dans le haras H2.....	202
Annexe n° 9: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour la quantification de <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air dans le haras H1	203
Annexe n° 10: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour la quantification de <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air dans le haras H2	204
Annexe n° 11: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les données climatologiques et relevé des conditions expérimentales dans le haras H1	205
Annexe n° 12: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les données climatologiques et relevé des conditions expérimentales dans le haras H2	206
Annexe n° 13: Tableau Excel présentant les caractéristiques des chevaux pour lesquels les fèces ont été prélevés dans le haras H1	207
Annexe n° 14: Tableau Excel présentant les caractéristiques des chevaux pour lesquels les fèces ont été prélevés dans le haras H2	208
Annexe n° 15: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les prélèvements de fèces dans le haras H1	209
Annexe n° 16: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les prélèvements de fèces dans le haras H2	210

Annexe n° 17: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les prélèvements de terre dans le haras H1	211
Annexe n° 18: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les prélèvements de terre dans le haras H2	212
Annexe n° 19: Tableau Excel présentant la liste des souches de <i>Rhodococcus equi</i> isolées pendant la campagne de prélèvement.....	213
Annexe n° 20: Comparaison des dates moyennes de naissances entre les poulains du haras H1 et ceux du haras H2. Résultats du test de Shapiro-Wilk et du test de Student.....	217
Annexe n° 21: Comparaison des dates de naissances moyennes entre les poulains sains et malades du haras H2. Résultats du test Mann-Whitney.	218
Annexe n° 22: Comparaison des concentrations moyennes de poussières mesurées dans le haras H1 et H2 Résultats du test Mann-Whitney.	218
Annexe n° 23: Comparaison des concentrations moyennes de poussières mesurées dans les paddocks et les champs. Résultats du test Mann-Whitney.	219

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANSES : Agence Nationale Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail

ANC : Acide Nalidixique Colimycine

BHI : Brain Heart Infusion

CIP : Capteur Individuel de Particules

CHERCHAR : Centre d’Études et de Recherches de Charbonnage de France

ÉAP : Épidémiologie Anatomo-Pathologie

EMA : Espace Mort Anatomique

Et al : *Et alii*

Ext : Extérieur

Fr : Fréquence Respiratoire

IFCE : Institut Français du Cheval et de l’Équitation

INC : Incorporation

INERIS : Institut National de l’Environnement Industriel et des Risques

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

ISO : International Organization for Standardization

LCD : Liquid Crystal Display

LHVP: Laboratoire d’Hygiène de la Ville de Paris

MBPE : Maladies Bactériennes et Parasitaires non zoonotiques des Équidés

NANAT : Nalidixic Acid Novobiomicin Actidione Tellurite

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PH : Potentiel Hydrogène

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

R.equi : *Rhodococcus equi*

Rés : Résidente

Rt-PCR : Real Time Polymerase Chain Reaction

SAS : Société par Action Simplifiée

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

UE : Union Européenne

UFC : Unité Formant Colonie

\dot{V}_a : Ventilation alvéolaire

Vap A : Virulence Associated Plasmid

VC : Volume Courant

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des Unités de mesure

μm : micromètre

mm : millimètre

m : mètre

km : kilomètre

m^2 : mètre carré

m^3 : mètre cube

min : minute

h : heure

ufc : unité formant colonie

μg : microgramme

mg : milligramme

kg : kilogramme

μl : microlitre

ml : millilitre

l : litre

ha : hectare

pb : paire de bases

kb : kilobase

INTRODUCTION

Rhodococcus equi est un coccobacille Gram positif principalement responsable de bronchopneumonies suppurées chez le poulain. La rhodococcose provoque des pertes considérables pour la filière équine avec des taux de morbidité et de mortalité élevés. Le taux de morbidité dans le monde est estimé entre 5 et 17% (Hillidge, 1987). Toutes les souches de *Rhodococcus equi* ne sont pas virulentes. La présence d'un plasmide de virulence, vap A, confère le pouvoir infectieux à la bactérie. *Rhodococcus equi* est également un agent pathogène opportuniste chez l'homme affectant majoritairement les individus immunodéprimés notamment ceux atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Prescott, 1991). *Rhodococcus equi* affecte également un grand nombre d'espèces animales en cas d'immunosuppression. Toutefois, l'espèce équine est atteinte préférentiellement (Kamboj *et al.*, 2005). *Rhodococcus equi* est une bactérie ubiquiste tellurique ; pourtant certains élevages équins sont sains alors que d'autres sont atteints de manière sporadique voire enzootique (Ainsworth, 1998; Barton, 1980). La contamination des poulains se fait à partir des crottins, du sol ou de poussières par inhalation (bronchopneumonie) ou plus rarement par ingestion (entérocolite). *Rhodococcus equi*, en tant que pathogène tellurique, est capable de se multiplier dans les excréments des herbivores et la contamination des paddocks et des pâtures peut s'accroître avec les années. La contamination par des poussières polluées en période chaude, associée à une baisse de l'immunité d'origine maternelle, explique que la majorité des cas surviennent en été (Giguère, 2000). D'ailleurs, le rôle des poussières dans l'aérosolisation de *Rhodococcus equi* est pressenti depuis de nombreuses années. Cependant, l'idée de mesurer la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air au moyen d'un collecteur d'air est apparue récemment (Muscatello et Browning, 2004). Cette technique utilisée a permis de quantifier la concentration de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air en un point fixe dans des élevages australiens ou irlandais. Le Laboratoire de Pathologie Équine (ANSES - Dozulé) a souhaité reproduire cette méthode en Basse-Normandie en 2009. Une pré-étude réalisée durant l'été 2009 dans un élevage reconnu comme atteint de manière enzootique par la rhodococcose a révélé des difficultés de transposition directe des techniques publiées. L'objectif de ce travail de thèse est donc dans un premier temps, d'adapter voire de modifier les techniques publiées afin notamment d'obtenir une technique fiable de quantification de *Rhodococcus equi* en aérosols et dans un deuxième temps de valider cette technique sur le terrain.

Le laboratoire de pathologie équine de l'ANSES de Dozulé réunit les compétences d'une trentaine de personnes afin d'améliorer la santé des chevaux. Il comprend trois structures de recherche : une unité maladies virales non zoonotiques, une unité maladies bactériennes et parasitaires non zoonotiques et une unité épidémiologie et anatomie pathologique. Enfin, ce centre est le laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la métrite contagieuse, la dourine, l'anémie infectieuse des équidés et l'artérite virale équine et les herpès viroses équines. L'implantation de ce laboratoire au cœur d'une zone d'élevage facilite l'organisation des enquêtes de terrain. Une étude a mis en évidence que la rhodococcose est la première cause de

mortalité chez les poulains autopsiés au laboratoire de pathologie équine de Dozulé (Mauger, 2009). Les avancées dans ce domaine suscitent donc l'intérêt des éleveurs.

Après une étude bibliographique de la rhodococcose, nous présenterons la phase de recherche et développement qui nous a conduit à proposer une nouvelle technique de quantification. Enfin, nous exposerons les modalités et les résultats de l'étude de validation menée dans un haras sain et un haras contaminé.

1 Étude bibliographique

1.1 GÉNÉRALITÉS SUR *RHODOCOCCUS EQUI*

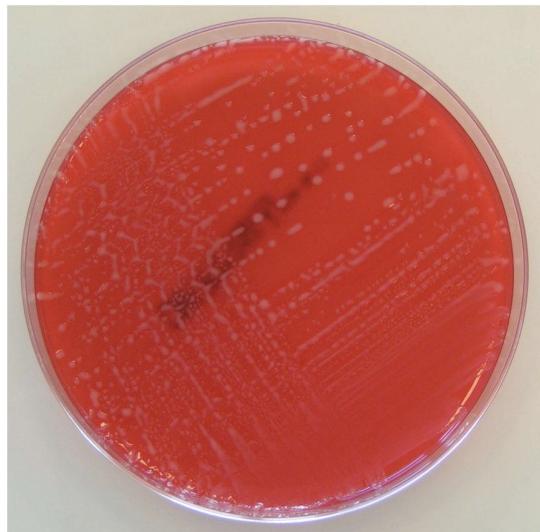
1.1.1 Caractères généraux

Rhodococcus equi a été décrite pour la première fois par Magnusson en 1923 chez un poulain développant une bronchopneumonie purulente (Magnusson, 1923). Connue initialement sous le nom de *Corynebacterium equi* et *Mycobacterium equi*, *Rhodococcus equi* est une bactérie intracellulaire qui se loge dans les macrophages. C'est une bactérie ubiquiste saprophyte et opportuniste. Elle appartient à la famille des Nocardiaceae, de l'ordre des Actinomycetales. C'est une bactérie :

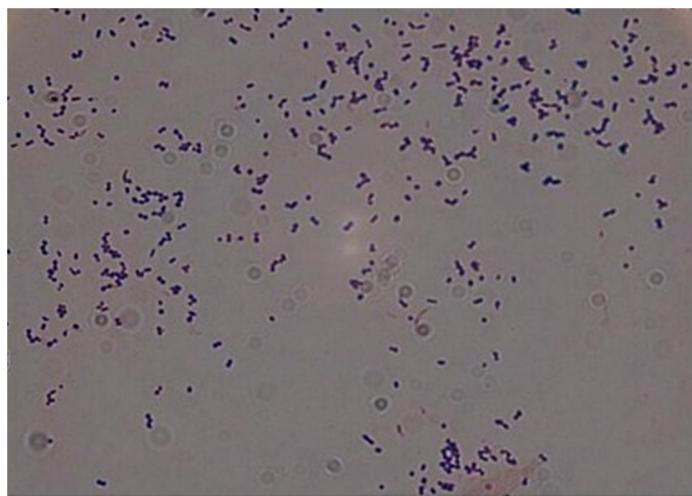
- Gram positive,
- immobile qui ne possède pas de flagelle,
- non sporulée,
- capsulée,
- aérobie stricte,
- catalase positive,
- pléomorphe, pouvant varier d'une forme cocobacillaire à bacillaire,
- à caractère acido-résistant.

La photographie n° 1 présente l'aspect des colonies de *Rhodococcus equi* en culture sur une boîte Columbia à l'Acide Nalidixique et à la Colimycine. Sur la photographie n° 2, la bactérie est visible après coloration de Gram.

Photographie n° 1: Colonies de Rhodococcus equi en culture sur une boîte Columbia à l'Acide Nalidixique et à la Colimycine (ANC) (Courtoisie de Corinne Sévin)



Photographie n° 2: Coloration de GRAM d'un frottis de Rhodococcus equi (Courtoisie de Corinne Sévin)



1.1.2 Facteurs de virulence

Rhodococcus equi se réplique à l'intérieur des macrophages. Cette prolifération intracellulaire conduit à la mort nécrotique du macrophage et est associée à des lésions massives du tissu pulmonaire.

1.1.2.1 Paroi cellulaire

La paroi de *Rhodococcus equi* est constituée de peptidoglycans et d'arabinogalactanes. Des acides mycoliques sont fixés sur les lipoglycans formant ainsi une barrière perméable aux composés hydrophiles. Ces acides mycoliques jouent un rôle négligeable dans la virulence de *Rhodococcus equi* (Sydor *et al.*, 2008). Le lipoarabinomannan est un complexe composant l'enveloppe cellulaire des mycobactéries et favoriserait l'adhérence des bactéries aux macrophages équins et donc leur pénétration intracellulaire (Garton *et al.*, 2002).

1.1.2.2 L'equi factor

L'equi factor est constitué de la phospholipase C et de la cholestérol oxydase. Cette enzyme est présente chez les souches virulentes et non virulentes. Le rôle de l'equi factor reste méconnu mais il pourrait contribuer à une dégénérescence des macrophages.

1.1.2.3 Plasmides

Les souches virulentes sont caractérisées par leur capacité à survivre et se répliquer dans les macrophages. Cette capacité leur est conférée par la présence d'un plasmide de virulence d'environ 80 à 90 kilobases (Giguère *et al.*, 1999). De nombreuses souches portant le plasmide de virulence ont été identifiées et sont très répandues dans le monde. Cependant, il n'y a pas de lien entre le type de plasmide de virulence et l'origine de la souche de *Rhodococcus equi*, qu'elle soit isolée lors d'une autopsie de poulain affecté par une bronchopneumonie à *Rhodococcus equi*, de prélèvements provenant de l'environnement ou bien d'échantillons de matières organiques (Duquesne *et al.*, 2010). Le plasmide de virulence a été séquencé et comporte 69 cadres ouverts de lecture dans 3 régions fonctionnelles (Takaï *et al.*, 2000). Deux d'entre elles contiennent des gènes semblables à ceux codant des protéines impliquées dans la conjugaison et la réPLICATION DES PLASMIDES. Cela laisse à penser que le plasmide de virulence peut être transféré de souches virulentes à des souches non virulentes. La troisième région est un îlot de pathogénicité de 27,5 kilobases codant pour 7 protéines associées à la virulence (vap A, C, D, E, F, G et H) et 4

protéines extracellulaires. Vap A est une lipoprotéine immunogène de 15 à 17 kilodaltons. La fonction exacte de vap A est encore inconnue mais son expression est nécessaire à la pathogénicité chez le poulain (Giguère *et al.*, 1999). Une étude sur 154 poulains suspects de bronchopneumonies à *Rhodococcus equi* a mis en évidence le gène vap A dans 98% des cas confirmant ainsi son rôle déterminant dans la virulence (Haites *et al.*, 1997; Monego *et al.*, 2009). La quasi-totalité des souches isolées chez des poulains contiennent et expriment vap A mais ceci n'est pas vérifié chez les autres espèces. Un second plasmide dont la taille varie entre 79 et 100 kilobases a été identifié et exprime vap B et non vap A (Makrai *et al.*, 2002). Chez les sujets affectés par *Rhodococcus equi* dans l'espèce humaine, vap A ou vap B peuvent être retrouvées.

1.1.3 Expression du plasmide de virulence *in vitro* et mise en culture de *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi est une bactérie ubiquiste dans le sol qui est répandue dans les matières fécales des herbivores. Aussi, l'expression des gènes de l'îlot de pathogénicité dépend au moins de 5 facteurs : la température, le pH, le stress oxydatif, le fer et le magnésium.

1.1.3.1 Température, pH, stress oxydatif

L'expression de certains gènes dépend des conditions environnementales. C'est notamment le cas du gène du plasmide de virulence vap A. Ainsi, l'expression maximale de vap A se produit pour une température de 37 °C et un pH de 5,0 (Meijer et Prescott, 2004). De plus, l'expression de vap A et vap G est stimulée lors d'un stress oxydatif (Benoit *et al.*, 2002).

1.1.3.2 Teneur en oligo-éléments de l'environnement

Dans une moindre mesure, les gènes de l'îlot de pathogénicité sont régulés par des oligo-éléments tels que le fer, le magnésium et le calcium (Ren et Prescott, 2003).

1.1.3.3 Milieux de culture et besoins nutritifs

Rhodococcus equi utilise du glycérol, des acides lactique, pyruvique, malique et succinique. Sur des milieux ordinaires, à 37 °C en atmosphère ordinaire, *Rhodococcus equi* se développe correctement. Les colonies sont visibles au bout de 16 à 18h. Elles sont lisses, rondes, translucides et muqueuses. Sur gélose ordinaire, elles se développent en 24 à 48 heures

d'incubation et prennent une coloration rosée caractéristique. Elles mesurent 1 à 3 mm de diamètre.

1.2 GÉNÉRALITÉS SUR LA RHODOCOCCOSE

1.2.1 Symptomatologie

1.2.1.1 Formes cliniques chez les équidés

La rhodococcose affecte préférentiellement les poulains âgés de 3 semaines à 6 mois. La forme pulmonaire est la plus fréquemment rencontrée. Elle peut parfois être associée à une autre forme.

1.2.1.1.1 Forme respiratoire

L'infection à *Rhodococcus equi* se manifeste par une bronchopneumonie pyogranulomateuse abcédée (Muscatello, 2011). Les signes cliniques sont le plus souvent insidieux et non spécifiques au début de la maladie rendant difficile un diagnostic précoce. Les signes cliniques les plus évocateurs sont une hyperthermie, une tachypnée, une dyspnée ainsi qu'une dilatation des naseaux. Une tachycardie est également présente. Dans des cas sévères, une cyanose des muqueuses peut survenir. La présence de toux et de jetage muco-purulent est inconstante. Cette forme peut également apparaître chez le cheval adulte lors d'une immunodépression marquée.

1.2.1.1.2 Autres formes

- ✓ Forme abdominale.

La forme digestive (entérocolite et abcération des nœuds lymphatiques digestifs) se manifeste rarement isolément. Elle est en général associée à une forme respiratoire (Zink *et al.*, 1986). Lors de forme digestive isolée, les poulains présentent des symptômes très frustres. De la diarrhée et des signes de coliques peuvent être présents mais de manière inconstante. Lors de forme mixte (forme pulmonaire et digestive), les symptômes les plus fréquents sont une

hyperthermie, des signes respiratoires et un amaigrissement. Comme lors de forme digestive isolée, la diarrhée est inconstante malgré la présence de lésions digestives (Ainsworth 1998; Giguère, 1997; Mauger 2009).

✓ Forme musculo-squelettique

Lors d'infection du système musculo-squelettique, les symptômes dépendent de la localisation lésionnelle : boiterie lors d'atteinte des membres (arthrites septiques et ostéomyélite des os longs), signes d'ataxie, parésie voire paralysie lors d'atteinte vertébrale. Ainsi, les signes cliniques les plus souvent rencontrés sont une effusion synoviale ainsi qu'une boiterie. Dans le cas d'ostéomyélite des corps vertébraux, le diagnostic est tardif lorsque l'infection s'étend à l'espace épidural provoquant alors une parésie ou une ataxie ou bien un syndrome de queue de cheval. Les poulains présentent également un amaigrissement, un retard de croissance et une hyperthermie (Mauger, 2009; Chaffin et Martens, 1997).

Par ailleurs, lors de forme(s) pulmonaire et/ou digestive, certains poulains développent des polyarthrites/synovites aseptiques (à médiation immune) qui ne semblent pas entraîner de boiterie. La polysynovite à médiation immune affecte principalement les articulations tibiotarsienne ou fémoro-tibiale (Sellon, 2007).

1.2.1.2 *La rhodococcose chez les autres espèces*

Rhodococcus equi peut également infecter d'autres espèces, domestiques ou sauvages. *Rhodococcus equi* a déjà été isolé chez les camélidés (Kinne *et al.*, 2011), les porcs, les bovins, les ovins, les caprins, les crocodiles, les chiens et les chats (Takai *et al.*, 2003). Les lésions sont limitées à une infection cutanée ou une abcédation des nœuds lymphatiques (Farias *et al.*, 2007).

Rhodococcus equi peut affecter l'homme provoquant des bronchopneumonies principalement chez les individus immunodéficients. C'est le cas des personnes atteintes par le SIDA (Topino *et al.*, 2010) ou ayant subies une transplantation (Tse *et al.*, 2008). Parmi les patients ayant contracté une pneumonie à *Rhodococcus equi*, le taux de mortalité chez les patients atteints par le VIH est de 55% contre 20% chez les individus immunodéprimés non atteints par le SIDA et 11% chez les individus immunocompétents (Kedlaya *et al.*, 2001).

1.2.2 Épidémiologie

À travers le monde, le taux de morbidité chez les poulains âgés de moins de 6 mois varie de 5 à 17% (Hillidge, 1987). Les taux de mortalité sont variables d'un élevage à l'autre. Ceux-ci sont compris entre 12,5 et 42% (Chaffin *et al.*, 2003b). La rhodococcose apparaît de manière sporadique dans la majorité des élevages. Cependant, elle touche certains d'entre eux de manière endémique chaque année. Dès lors, ces élevages éprouvent de réelles difficultés à éradiquer la maladie. À ce jour, il n'a pas été mis en évidence de prédisposition de race ou de sexe. Le moment auquel s'infecte les poulains n'est pas clairement défini. La pneumonie à *Rhodococcus equi* affecte principalement les poulains entre 3 semaines et 6 mois. Pourtant, l'hypothèse d'une infection possible dès les premiers jours de vie du poulain a été émise. Ainsi *Rhodococcus equi* a été isolé dans les fèces de poulains âgés de 3 jours (Horowitz *et al.*, 2001).

1.2.3 Conséquences économiques

L'infection à *Rhodococcus equi* entraîne des pertes économiques directes et indirectes. En effet, le coût du traitement d'un poulain est élevé. De plus, la rhodococcose influe probablement de manière néfaste sur les performances des futurs animaux (Dorothy M. Ainsworth, 1997). Une grande partie des poulains touchée par la rhodococcose ne survit pas ou bien ne courrent jamais. Néanmoins certains poulains atteints de rhodococcose ont obtenu ensuite des résultats satisfaisants en course (Christley, 1994).

1.2.4 Pathogénie de l'infection

1.2.4.1 Mode de contamination

La contamination du poulain s'effectue principalement par inhalation de la bactérie. Il est suspecté que *Rhodococcus equi* présent dans l'air, libre en suspension ou transporté par des aérosols, se dépose sur la muqueuse du tractus respiratoire inférieur. *Rhodococcus equi* colonise l'épithélium bronchiolaire et pénètre dans les macrophages alvéolaires

1.2.4.2 Modalités de l'infection

Il a été étudié expérimentalement chez la souris qu'avec la délétion du plasmide de virulence vap A, *Rhodococcus equi* n'est plus capable de se répliquer puis de détruire les macrophages (Jain *et al.*, 2003). Ce plasmide est donc essentiel. La bactérie interagit avec un récepteur de surface du macrophage puis est phagocytée. Une fois dans le macrophage,

Rhodococcus equi virulent se multiplie. Cette réPLICATION a pour conséquence la destruction du macrophage infecté. D'autres facteurs tels que la capsule de polysaccharides, la présence de lipoglycaneS et de l'enzyme cholestérol oxydase contribue également à la virulence.

1.2.4.3 Sensibilité du poulain et mécanismes de protection

Potentiellement, tous les poulains peuvent être exposés à *Rhodococcus equi* dans les premiers temps de leurs vies. Pourtant la plupart d'entre eux ne contractent pas la maladie. Puisque les adultes immunocompétents résistent à cette infection, il est probable que les poulains malades présentent un déficit immunitaire.

Plusieurs études suggèrent que la majorité des poulains s'infectent à la période durant laquelle l'immunité d'origine maternelle a chuté alors que l'immunité propre du poulain est encore insuffisamment développée. Les travaux de Zink *et al.* 1986 mettent en évidence un début des signes cliniques chez des poulains âgés de moins de 2 mois en général et la venue de la mort entre l'âge de 1 et 4 mois dans la plupart des cas avec une moyenne de 11 semaines. Dans une autre étude portant sur 54 poulains autopsiés atteints de rhodococcose, l'âge moyen de la mort était similaire: 70 +/- 21 jours (Takaï *et al.*, 1994). Enfin, dans une étude réalisée à partir de 199 cas autopsiés, la fréquence d'infection à *Rhodococcus equi* est la plus importante chez des poulains morts à l'âge de 1 à 6 mois (Mauger, 2009). Ainsi, c'est au cours de la période de 1 à 3 mois, appelée période de sensibilité que l'on observe le plus souvent les infections à *Rhodococcus equi*. Au cours de leurs premières semaines de vie, les poulains bénéficient d'une protection immunitaire grâce aux anticorps colostraux. Ce n'est qu'au cours du troisième mois que leur système immunitaire propre prendra le relais de l'immunité passive.

En ce qui concerne l'immunité innée, les macrophages et les neutrophiles semblent jouer un rôle important. Ainsi les souris possédant des macrophages déficients sont davantage susceptibles à l'infection à *Rhodococcus equi*. Chez la souris, la présence d'un déficit de neutrophiles la première semaine après l'infection provoque des symptômes plus sévères et les concentrations tissulaires en *Rhodococcus equi* sont augmentées (Martens *et al.*, 2005).

1.2.5 Lésions observées

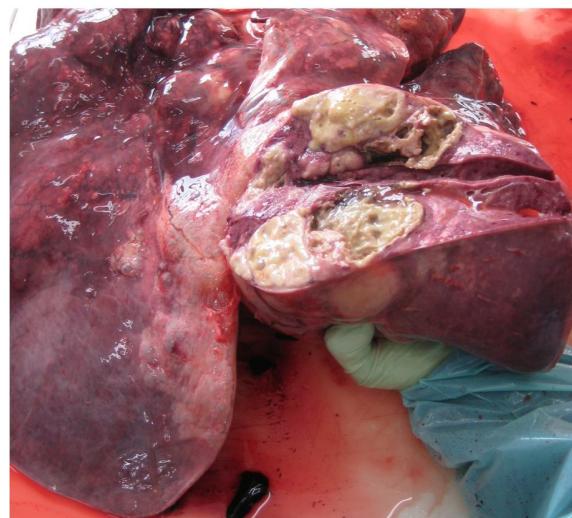
Chez les poulains atteints par la forme pulmonaire (photographie n° 3), une bronchopneumonie suppurative caractérisée par des abcès disséminés dans le parenchyme (à pus crémeux ou caséux) et ainsi qu'une lymphadénite suppurative des nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux sont mis en évidence. Les cas de pleurésie sont plus rares (Mauger 2009).

Dans le cas des formes intestinales (photographie n° 4), les lésions prédominantes sont une hypertrophie et une abcération des nœuds lymphatiques caecocoliques et mésentériques, une typhlocolite ulcérale et une hyperplasie et/ou abcération et/ou ulcération des formations lymphoïdes du tractus digestif (Mauger, 2009).

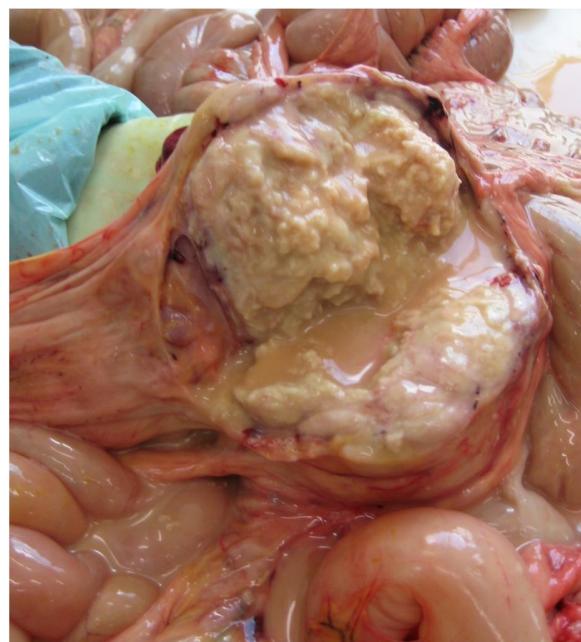
Cette atteinte digestive est la forme extra-pulmonaire la fréquemment rencontrée. En effet, des lésions caractéristiques de la forme abdominale étaient présentes à l'autopsie dans 25% (Mauger, 2009) à plus de 50% des cas de rhodococcose, le plus souvent associées à des lésions pulmonaires (Zink *et al.*, 1986).

Les lésions musculo-squelettiques les plus fréquentes sont les arthrites septiques et des ostéomyélites métaphysaires. Des ostéomyélites/arthrites vertébrales accompagnées de suppuration musculaire peuvent également être rencontrées (Mauger, 2009). Les lésions rachidiennes sont souvent associées à une pachyméningite suppurée (inflammation de la dure-mère avec épaisseissement) (Chaffin et Martens, 1997).

*Photographie n° 3: Forme pulmonaire.
Autopsie d'un poulain au laboratoire de pathologie équine*



*Photographie n° 4: Forme intestinale.
Autopsie d'un poulain au laboratoire de pathologie équine*



1.2.6 Moyens diagnostiques

Il est difficile de diagnostiquer la rhodococcose précocement. Si les signes cliniques sont assez peu spécifiques au stade initial de la maladie, les modifications hématobiochimiques telle qu'une hyperfibrinogénémie associée à une leucocytose neutrophilique peuvent être mis en évidence relativement tôt (Prescott, 1991). La radiographie et surtout l'échographie thoracique sont des outils complémentaires fiables pour détecter la présence des abcès pulmonaires. Le diagnostic de laboratoire repose sur la réalisation d'une aspiration trans-trachéale. Un antibiogramme peut également être réalisé sur la souche isolée. Enfin, des tests sérologiques sont envisageables mais possèdent de faibles sensibilité et spécificité (Martens *et al.*, 2002a).

1.2.7 Traitements

L'antibiothérapie constitue la clé de voûte dans le traitement de la rhodococcose. L'association érythromycine-rifampicine permet d'améliorer le pronostic des poulains atteints (Giguère et Prescott, 1997). L'azithromycine et la clarithromycine ont été proposés pour remplacer l'érythromycine dans le traitement érythromycine-rifampicine de la rhodococcose (Giguère *et al.*, 2004). L'association clarithromycine-rifampicine semble avoir un meilleur résultat dans le traitement de la rhodococcose que l'association érythromycine alors que l'association azithromycine-rifampicine n'a que l'avantage de réduire le nombre d'administrations par jour (Giguère *et al.*, 2004). La tulathromycine a également été récemment proposée et semble être un traitement prometteur (Venner *et al.*, 2007). Une thérapie adjuvante est conduite avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des bronchodilatateurs et des mucolytiques.

1.3 LES MÉTHODES DE QUANTIFICATION DE *RHODOCOCCUS EQUI*

1.3.1 Technique de mise en culture

Un milieu sélectif, inhibant le développement d'autres micro-organismes, a été développé pour *Rhodococcus equi* (Woolcock *et al.*, 1979). Ce milieu à base de trypticase soja agar est supplémenté avec de l'acide nalidixique (20 µg/ml), de la novobiocine (25 µg/ml), de l'actidione (40 µg/ml) et du potassium tellurite (0,005 %) ; il est appelé NANAT. Un deuxième milieu sélectif a été développé plus récemment. Il s'agit d'un milieu Mueller-Hinton agar supplémenté avec de la ceftazidime (20 µg/ml) et de la novobiocine (25 µg/ml) ; il est dénommé CAZ-NB.

Une étude comparative de ces deux milieux a mis en évidence que le milieu NANAT était plus favorable au développement de *Rhodococcus equi* mais que le nombre de souches virulentes comptabilisées sur milieu CAZ-NB était malgré tout supérieur (Muscatello *et al.*, 2007).

1.3.2 Quantification dans le sol

En ce qui concerne la quantification de *Rhodococcus equi* dans le sol, des protocoles similaires ont été décrits (Takai *et al.*, 1987; Debey *et al.*, 1987; Prescott *et al.* 1984). Le principe consiste à prélever un échantillon de terre sur la surface concernée, d'en peser 1 g puis de le diluer dans un volume d'eau distillée ou une solution tampon et d'effectuer des dilutions au 1/10ème. Chacune des dilutions a été mise en culture sur 2 milieux NANAT. Ces milieux inoculés sont ensuite incubés à 37 °C pendant 3 jours.

1.3.3 Quantification dans les fèces

Pour ce qui est de la quantification dans les fèces, différentes méthodes ont été décrites. Pour les premières, les fèces ont été prélevés au sol ou bien directement dans le rectum (Takai *et al.*, 1987; Prescott *et al.*, 1984). Le protocole utilisé est identique au premier décrit pour la quantification dans le sol.

Une autre étude propose un protocole de quantification de *Rhodococcus equi* dans les fèces (Grimm *et al.*, 2007). Dans cette étude, une fois prélevés au sol ou dans le rectum, les fèces sont réfrigérés à +4°C puis congelés à -20 °C dans les 48 heures. Pour chaque prélèvement, 1 g a été mélangé avec 5 g de PBS (tampon phosphate). Des dilutions successives au 1/10ème ont été effectuées. Un volume de 100 µl de chaque suspension a été inoculé sur un milieu NANAT modifié. Les cultures réalisées en duplicité ont été placées à +34 °C pendant 48 heures. Le milieu NANAT modifié est fabriqué à base de bouillon de bœuf (300 ml), eau distillée (600 ml), peptone (20 g), chlorure de sodium (5 g), extrait de levure (5 g), glucose (5 g), dithionite de sodium (0,2g), thiosulfate de sodium (1,2 g), phosphate de potassium (2 g), agar (15 g). Après traitement, le milieu a été supplémenté avec de l'acide nalidixique (20 µg/ml), de la novobiocine (25 µg/ml), de l'actidione (40 µg/ml) et du potassium tellurite (3,5 %). Le nombre de colonies de *Rhodococcus equi* est ensuite calculé en UFC/g de terre. Une technique d'immunoblotting permet ensuite de détecter vap A et donc les *Rhodococcus equi* virulents.

1.3.4 Quantification dans l'air

Différentes tentatives de quantifications de *Rhodococcus equi* dans l'air sont présentées. Dans la première (Takai *et al.*, 1987), le site de prélèvement était situé au box à un mètre du sol. Ainsi les couvercles de deux boîtes NANAT sont ôtés. Après 15 minutes, les boîtes sont refermées et incubées à +37 °C pendant 3 jours.

Plus récemment, une deuxième technique a été proposée (Muscatello et Browning, 2004). Dans cette étude, un système portable de prélèvement d'air a été utilisé, le M Air T portable Air tester, fabriqué par la SAS Millipore dans lequel est placé un milieu de culture NANAT. Il s'agit d'un appareil impacteur permettant d'aspirer 140 litres d'air par minute. Le système d'impaction entraîne les micro-organismes contre un milieu solide lors de l'aspiration. Pour ces prélèvements, l'appareil est placé à 5 cm du sol pendant la durée nécessaire pour aspirer 500 litres d'air. Les boîtes NANAT sont ensuite incubées à +37 °C pendant 48 heures. L'hybridation d'un produit de PCR spécifique du plasmide VapA permet ensuite de détecter et de quantifier *Rhodococcus equi* virulent.

1.4 FACTEURS DE RISQUES DE LA RHODOCOCCOSE ET PRÉVENTION

1.4.1 Charge en *Rhodococcus equi* dans le sol et dans l'air

Plusieurs études rapportent l'existence d'un lien entre la présence de *Rhodococcus equi* dans le sol et les pneumonies à *Rhodococcus equi* chez les poulains fréquentant ces surfaces. Ainsi, lors d'une enzootie de pneumonie à *Rhodococcus equi* dans un élevage, des prélèvements de terre ont mis en évidence la bactérie aux endroits où évoluaient les poulains atteints mais son absence dans les autres lieux. Les plus fortes concentrations ont été retrouvées aux lieux où la poussière était particulièrement visible (Smith et Robinson, 1981).

Les caractéristiques physico-chimiques des sols de 21 élevages indemnes et de 24 élevages touchés par la rhodococcose ont été analysées et comparées (Cohen *et al.*, 2008). Il s'agissait de prélèvements de surface dans les zones fréquentées par les poulains. Aucune différence significative n'a été rapportée en ce qui concerne le pH ou la salinité du sol, les

quantités de nitrates, phosphore, potassium, calcium, magnésium, sodium, souffre, zinc, fer, manganèse ou cuivre dans le sol.

Plus récemment, une étude a comparé la présence de *Rhodococcus equi* virulent dans les sols de deux groupes de haras, l'un avec des cas récurrents de rhodococcose (33 élevages) et l'autre non affecté (33 élevages). L'échantillon de terre était prélevé en surface. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives. La présence de *Rhodococcus equi* virulent dans le sol ne permet donc pas de préjuger de la prévalence de la rhodococcose dans un élevage (Martens *et al.*, 2000).

Une autre étude a étudié la présence de *Rhodococcus equi* dans les sols deux groupes de haras, l'un indemne, l'autre affecté par la rhodococcose. Cette présence a été quantifiée en UFC par gramme de terre prélevé en surface. *Rhodococcus equi* virulent a été mis en évidence dans tous les haras. De nouveau, il a été démontré qu'il n'y a pas d'association entre la prévalence de la rhodococcose et la quantité de *Rhodococcus equi* virulent (Chaffin *et al.*, 2003a).

Une enquête a tenté de déterminer si les juments constituaient une source de *Rhodococcus equi* importante pour leurs poulains (Grimm *et al.*, 2007). Au sein d'un même élevage, les prélèvements ont été réalisés sur les 171 juments, 2 fois avant et 2 fois après le poulinage. *Rhodococcus equi* virulent a été mis en évidence au moins une fois chez chaque jument et à chaque prélèvement pour 36% d'entre elles. Parmi les 171 poulains, 31% ont développé une pneumonie à *Rhodococcus equi*. Les résultats montrent que les concentrations fécales en *Rhodococcus equi* total ou virulent ne sont pas significativement différentes chez les juments dont le poulain a été affecté par la rhodococcose.

Si la majorité des études ont montré que la charge en *Rhodococcus equi* virulent dans le sol ne constitue pas un facteur de risque de rhodococcose, sa présence dans l'air semble être un facteur déterminant. La technique proposée par Msucatello et Browning a été employée pour étudier la relation entre la concentration en *Rhodococcus equi* virulent dans l'air et la prévalence des pneumonies à *Rhodococcus equi* (Muscatello *et al.*, 2006a). Ces prélèvements d'air ont été réalisés dans des zones présentant un défaut d'enherbement, notamment les couloirs dans lesquels sont regroupés les poulains ou bien le pourtour des paddocks. Les concentrations mesurées s'échelonnent de 0 à 136 UFC/m³ d'air. L'interprétation des résultats conduit à affirmer qu'il existe un lien entre la prévalence de la rhodococcose et *Rhodococcus equi* dans l'air, aussi bien en terme de concentration que de proportion.

En déterminant les concentrations en *Rhodococcus equi* dans deux élevages connaissant des cas récurrents de rhodococcose, une étude a montré qu'il n'y avait pas de variations selon le temps (Kuskie *et al.*, 2011). Ces mesures ont été menées avec un biocollecteur d'air à impaction, le MAS-100 Eco fabriqué par Merck INC dans lequel ont été placés des milieux NANAT. Il permet d'aspirer l'air à un débit constant de 100 litres par minute. Ces mesures ont mis en évidence que les concentrations en *Rhodococcus equi* étaient plus élevées au paddock qu'au box.

Cependant, il est à noter qu'elles sont plus importantes lorsque les chevaux sont présents lors du prélèvement et ce quelque soit la surface.

Auparavant, une étude avait montré dans 3 élevages atteints par la rhodococcose de manière endémique que l'air au box présentait une concentration en *Rhodococcus equi* plus importante au box qu'au paddock avec une probabilité 17,3 fois plus importante de détection (Muscatello *et al.*, 2006b).

1.4.2 Facteurs de risque liés à la structure et aux pratiques d'élevage

Une étude cas témoins, comparant un groupe de haras atteints de manière endémique (29 élevages) et un groupe de haras indemnes (63 élevages) en France, a mis en lumière des facteurs de risque de rhodococcose pulmonaire liés à la structure de l'élevage (Tapprest *et al.*, 2012). Ainsi, le facteur de risque prépondérant est l'exposition des poulains à la poussière. D'autres facteurs interviennent tels que le dépassement des capacités maximales d'accueil des poulinières, la présence de naissances tardives et l'utilisation des mêmes équipements médicaux pour les juments résidentes et juments de passage. Ces équipements sont une barre d'échographie ou d'insémination. Ces facteurs sont également mis en exergue par une étude cas-témoins américaine concernant 138 élevages (Chaffin *et al.*, 2003a). Ainsi, les élevages de grande taille avec un grand nombre juments et de poulains sont significativement associés à une plus grande prévalence des pneumonies à *Rhodococcus equi*. Dans cette même enquête, les cas de pneumonies étaient associés à la présence d'un environnement jugé subjectivement comme poussiéreux par les observateurs. Il a été démontré qu'une faible hygrométrie du sol et une faible hauteur de pâturage sont significativement associés à une concentration élevée en *Rhodococcus equi* virulent dans l'air et d'après cette même étude, à une plus forte prévalence de pneumonies à *Rhodococcus equi* (Muscatello *et al.*, 2006a).

L'influence des pratiques d'élevage a été évaluée dans une enquête cas-témoins comportant 64 élevages (Chaffin *et al.*, 2003a). Il ressort que, par rapport aux élevages indemnes, les élevages affectés encadrent davantage les naissances, réalisent davantage de tests pour évaluer l'immunité passive, administrent davantage du plasma hyperimmun, vaccinent davantage les juments et les poulains contre l'infection à *Streptococcus equi* et établissent une lutte antihelminthique plus régulière. En conclusion, la pneumonie à *Rhodococcus equi* n'est pas associée à une mauvaise conduite d'élevage. Une étude menée sur 220 poulains a tenté de mettre en évidence des facteurs de risque intrinsèques au poulain dans des élevages endémiques. Il apparaît que les risques qu'un poulain développe une pneumonie à *Rhodococcus equi* sont liés à l'élevage et à l'année (Chaffin *et al.*, 2003b). Ces observations semblent souligner le rôle important que remplissent les facteurs environnementaux tels la quantité de précipitations ou la présence de poussières dans les surfaces où évoluent les poulains.

2 Recherche et développement

Pour quantifier la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air, la méthode utilisée par Muscatello décrit l'utilisation d'un appareil à impaction, le M Air T (Millipore) dans lequel sont insérés des milieux de culture solides spécifiques NANAT. Une hybridation permet de détecter les souches virulentes comportant vap A. Dans cette étude l'appareil est placé à 5 cm du sol. En 2009, le laboratoire de pathologie équine de Dozulé a fait l'acquisition d'un appareil à impaction du même type : l'air idéal 3P® possédant les mêmes caractéristiques. Les essais pratiqués dans les haras bas-normands ont mis en évidence des résultats décevants et des difficultés à distinguer les souches virulentes des souches avirulentes. Nous avons donc comparé différentes techniques de collecte de la bactérie dans l'air et développé des protocoles pour obtenir des résultats optimaux.

2.1 REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE LIEUX CONTAMINÉS

2.1.1 Les lieux

2.1.1.1 *Les parcelles, milieu extérieur*

Dans un premier temps, nous avons souhaité tester différents types d'analyseurs microbiologiques. Dans cette perspective, il nous a d'abord fallu recréer des situations établies afin de pouvoir comparer les appareils dans des conditions identiques. Nous avons donc créé des lieux contaminés artificiellement par *Rhodococcus equi*. Ainsi le 25 août 2010 nous avons délimité deux parcelles carrées de 4 mètres de côté, initialement indemnes de *Rhodococcus equi*. Ces parcelles, situées au sud du bâtiment de l'unité d'Épidémiologie et d'Anatomie Pathologie (ÉAP) du laboratoire de pathologie équine de l'ANSES, ont été contaminées par *Rhodococcus equi*. De plus, pour reproduire les variations observées selon le type de terrain, nous avons décidé de laisser une parcelle plantée d'une herbe abondante et de retourner la terre de la deuxième pour obtenir une parcelle entièrement bêchée et donc davantage poussiéreuse par temps sec (photographie n° 5). Ce dernier type de parcelle est appelé parcelle « en terre » est présenté à la photographie n° 6. Chaque parcelle a été délimitée par une clôture afin de prévenir toute entrée par inadvertance. Des sur chaussures à usage unique sont nécessaires pour rentrer sur chaque parcelle.

Photographie n° 5: Du côté sud du bâtiment de l'unité de l'ÉAP, les deux parcelles contaminées par Rhodococcus equi. Au sud, côté est, la parcelle contaminée en herbe



Photographie n° 6: Au sud, côté ouest, la parcelle contaminée en terre



2.1.1.2 Le box, milieu confiné

Afin de pouvoir comparer par la suite les concentrations de *Rhodococcus equi* dans l'air ainsi que les performances des appareils, nous avons également reproduit les conditions d'un milieu confiné contaminé. Nous avons retenu le modèle du box paillé comme le montrent les photographies n° 7 et n° 8. Il s'agit d'un box carré de 3,5 mètres de côté, fermé par une porte en bois et correctement paillé. Nous avons choisi ce type de modèle car le box paillé est le plus communément rencontré dans les élevages. De plus la paille est une litière propice à la mise en suspension de particules dans l'air contrairement au lin ou bien aux copeaux. Ce box est initialement indemne en *Rhodococcus equi*.

Photographie n° 7: Les box vus de l'extérieur



Photographie n° 8: Le box paillé contaminé



2.1.2 Protocole de contamination

Le protocole utilisé pour ensemencer les surfaces est reproduit pour assurer une contamination similaire. Nous avons utilisé une souche de *Rhodococcus equi* virulente issue de la souchothèque construite à partir de souche isolées lors des autopsies. La souche utilisée est celle prélevée sur le poulain Urola recueillie en 2005. Les souches de *Rhodococcus equi* sont conservées à -80 °C sur cryobilles.

Matériel :

- Souche de *Rhodococcus equi* virulente sur cryobille,
- 36 ml de BHI Biomérieux (milieu Brain Heart Infusion dont la composition est donnée en annexe n° 1),
- 4 tubes avec leurs bouchons,
- Autoclave,
- Pipette graduée 100 µl,
- Pipeteur automatique,
- 4 bouteilles de 500 ml,
- Gants en latex,
- 2 l de milieu cœur cervelle,
- 10 kg de crottins frais exempts de *Rhodococcus equi*,
- Boîte de gélose ANC (composition en annexe n° 2).

Protocole :

- Mettre 2 cryobilles contenant la souche de *Rhodococcus equi* dans 9 ml de BHI Biomérieux,
- Répéter cette opération pour avoir 4 tubes distincts,
- Mettre ensuite ces préparations à + 37 °C pendant 24 h,
- Préparer 2 l de milieu de culture cœur cervelle,
- Stériliser le milieu à + 121 °C pendant 15 min à l'autoclave,
- Mélanger le contenu d'un tube de culture de *Rhodococcus equi* à 500 ml de milieu cœur cervelle stérilisé,
- Mettre en culture les 4 bouteilles obtenues à + 37 °C pendant 48 h sous agitation,
- Prélever 100 µl pour le comptage et ensemencer une boîte de gélose ANC,
- Mélanger ensuite le contenu d'une bouteille à 2,5 kg de crottins indemnes de *Rhodococcus equi* et fraîchement récoltés.

Avant le mélange avec les crottins, un comptage est réalisé. Le comptage révèle la présence de 4.10^8 *Rhodococcus equi*/500 ml de solution soit $1,6.10^5$ *Rhodococcus equi*/g de fèces. Les crottins contaminés sont donc déposés le 30 août 2010 d'une manière assez homogène dans les parcelles côté sud. Elles sont désormais contaminées.

La préparation des cultures de *Rhodococcus equi* destinées à la contamination du box paillé a débuté le 8 septembre 2010. Les crottins contaminés sont déposés dans le box le 13 septembre 2010. Un comptage avant le dépôt des crottins a révélé la présence de 4.10^6 *Rhodococcus equi* par gramme de fèces.

2.1.3 Vérifications périodiques de la persistance de la contamination

Plusieurs contrôles du niveau de contamination ont été menés suite à cette opération de contamination. Nous avons donc vérifié la présence de *Rhodococcus equi* le 8 septembre, le 30 septembre et le 20 octobre. Pour évaluer ce niveau, nous avons prélevé du crottin en surface ainsi que de la terre à environ 5 centimètres de profondeur sous les crottins. Un prélèvement de terre situé entre les deux parcelles contaminées constitue le témoin négatif. Ce site est distant d'environ 2 mètres de chaque parcelle contaminée.

Matériel :

- Balance,
- Eau physiologique stérile,
- Pipette graduée de 100 µl,
- Pipeteur automatique,
- Bec bunsen,
- Tubes 50 ml à fond conique et leurs bouchons,
- Pipette râteau,
- Étuve,
- Boîte de gélose ANC,
- Agitateur mécanique,
- Gants en latex.

Protocole :

- Pesar 1 g de terre ou de fèces,
- Y ajouter 40 ml d'eau physiologique stérile,
- Placer sous agitation pendant 30 min à + 37 °C,
- Prélever 100 µl de la préparation obtenue et les déposer sur une gélose ANC,
- Étalement avec une pipette râteau,
- Placer les boîtes de gélose à +37 °C durant 24 puis 48 heures,
- La première lecture a donc lieu 24 h après ensemencement et la deuxième 72 h après ensemencement.

L'utilisation d'une gélose ANC Columbia avec 5 % de sang de mouton permet l'inhibition des bactéries Gram négatives grâce à la présence de deux antibiotiques : la colimycine et l'acide nalidixique. *Rhodococcus equi* est présent dans les fèces et dans les prélèvements de terre des parcelles contaminées en terre et en herbe. Enfin le témoin négatif qui était un échantillon de terre situé en dehors des parcelles contaminées est exempt de *Rhodococcus equi*. Nous avons donc recréé des conditions expérimentales exploitables.

2.2 RELEVÉ DES CONDITIONS MÉTÉOROLOGIQUES

Afin de pouvoir repérer les paramètres météorologiques qui interviendraient dans des variations de la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'environnement, nous avons déterminé et mis au point des protocoles pour réaliser ces relevés.

2.2.1 Les paramètres météorologiques étudiés dans la bibliographie

D'après la littérature, les conditions climatiques pourraient être en lien avec la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'environnement ou bien l'incidence de la rhodococcose chez les poulains présents. Ainsi, les jours « venteux » et « secs » sont associés à une augmentation de la concentration de *Rhodococcus equi* dans le sol alors que les jours pluvieux sont eux associés à sa diminution (Takai *et al.*, 1987). Plus récemment, la corrélation entre l'incidence clinique et certains paramètres environnementaux tels que : l'humidité du sol, la hauteur de l'herbe, le pH du sol mais aussi des paramètres purement climatiques : température, humidité de l'air ou vitesse du vent ont été étudiés (Muscatello *et al.*, 2006a).

2.2.2 Les paramètres relevés avec la première station météorologique

Dès le début, il nous a paru important d'effectuer un relevé des conditions climatiques parallèlement aux mesures environnementales. Dans un premier temps, nous avons utilisé une station météorologique disponible dans le laboratoire de l'ANSES. La photographie n° 9 montre cette station de marque OREGON SCIENTIFIC® permettant une mesure de la température et de l'anémométrie grâce à des sondes fixées sur une potence fabriquée par nos soins (photographie n° 10). Les informations étaient transmises en temps réel par ondes radio à une centrale portable. Cette station s'est avérée très rapidement obsolète et encombrante.

Photographie n° 9: la centrale OREGON SCIENTIFIC®



Photographie n° 10: Les sondes fixées sur la potence



Photographie n° 11: La sonde CONRAD®



2.2.3 Les paramètres relevés avec la deuxième station météorologique

Afin de poursuivre le relevé des paramètres climatiques, nous avons donc fait l'acquisition d'une sonde CONRAD®, plus petite, plus maniable et offrant davantage de fonctionnalités. Ainsi outre la mesure de la vitesse du vent et la température, cette sonde évalue également l'hygrométrie. Cette sonde, présentée à la photographie n° 11 permet de réaliser des mesures instantanées. Elle n'autorise pas la programmation, les moyennes, ou la mémorisation.

Nous avons alors établi un protocole pour le relevé des conditions météorologiques. Après avoir relevé la date, les heures de l'expérience, nous notons si le temps est sec ou pluvieux puis nous mesurons la température, l'hygrométrie ainsi que l'anémométrie selon la direction du vent dominant.

Après avoir défini nos conditions expérimentales et nos instruments de mesures climatiques, nous pouvons désormais mettre à l'épreuve les analyseurs microbiologiques.

2.3 PRÉLÈVEMENTS D'AIR

2.3.1 Quantification de *Rhodococcus equi*

Les aérosols sont définis comme une suspension, dans un milieu gazeux, de particules solides ou liquides présentant une vitesse de chute négligeable (ISO 3649). Les bioaérosols sont des microorganismes aéroportés. Nous avons recherché les échantillonneurs d'aérosols disponibles sur le marché qui pourraient être susceptibles de recueillir *Rhodococcus equi* en aérosols. La détection et la quantification des micro-organismes dans les échantillons peuvent être ensuite effectuées par le biais des méthodes d'analyse utilisées en microbiologie. À ce titre nous avons rencontré Monsieur Didier Huonnic, agent de l'ANSES Ploufragan étudiant la qualité de l'air (Huneau-Salaun *et al.*, 2011) et ses conséquences sur la santé humaine dans les élevages de poules pondeuses (Huneau-Salaun *et al.*, 2010). Cette rencontre s'est tenue fin août 2010 à l'ANSES Ploufragan dans les Côtes d'Armor. Au cours de cette entrevue, Monsieur Huonnic et son équipe ont partagé leur expérience dans le domaine de l'échantillonnage des aérosols puis ont réalisé une démonstration du fonctionnement de deux types d'appareils : le Capteur individuel de Particule (CIP) et la pompe Deluxe 224-PCMTX8. Ensuite Monsieur Huonnic nous a prêté les appareils et les accessoires d'échantillonnage d'aérosol afin que nous puissions mener nos essais comparatifs. De notre côté, l'ANSES Dozulé disposait d'un autre échantillonneur d'aérosol, l'Air idéal®3P. Ce collecteur d'aérosols à impaction, semblable à celui décrit dans la technique proposée récemment (Muscatello et Browning, 2004), avait été acquis en 2009 pour une pré étude. Nous avons pu procéder à la comparaison de ces 3 analyseurs microbiologiques de l'air en toute objectivité dans des conditions définies. Avant de présenter les résultats des essais comparatifs, nous allons revenir sur les caractéristiques détaillées de chaque appareil ainsi que leur fonctionnement.

2.3.1.1 Présentation du CIP, de l'Air idéal®3P et de la pompe DELUXE

2.3.1.1.1 L'Air idéal®3P

2.3.1.1.1.1 Caractéristiques

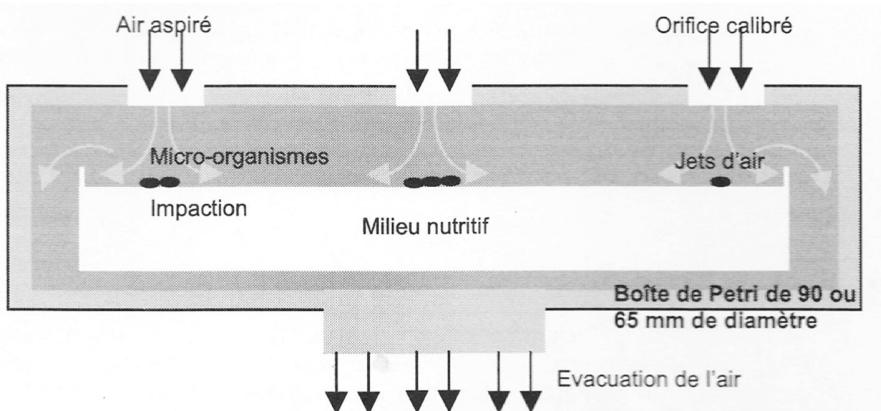
C'est ce type d'appareil qui a été utilisé par Muscatello *et al.* dans la seule technique décrite pour quantifier *Rhodococcus equi* dans l'air. L'Air idéal®3P est commercialisé par la société BioMérieux. Il a été développé pour les industriels du médicament comme outil garantissant un échantillonnage de l'air scientifiquement éprouvé. Il est également adapté au dénombrement de micro-organismes aéroportés issus d'environnements de travail moins contraignants comme l'industrie agroalimentaire. Il existe en deux versions : l'une permettant l'utilisation de milieux de culture en boîtes de Pétri de 65 ou 70 mm et l'autre conçue pour être

utilisée avec des boîtes de 90 mm de diamètre. C'est de cette dernière version dont nous disposons (photographie n° 12). Son numéro de série est le 091861. Il est étalonné annuellement par un laboratoire indépendant, le CETIAT. Il possède un débit d'aspiration de 100 l/min. Il a été certifié conforme pour la valeur de 100 l/min +/- 6,6 l/min. L'appareil est livré avec 5 cibles de prélèvement et est compatible avec une large gamme de milieu de culture. Il est utilisable dans une grande plage de température de +0 à +40 °C et d'hygrométrie ambiante de 0 à 95 %. Le crible de prélèvement est autoclavable. Il est conseillé de le stériliser pendant 18 minutes à +134 °C. L'Air idéal®3P est programmable et peut se suspendre à un crochet ou bien être maintenu par ses poignées. L'autonomie annoncée est de 5 heures de prélèvement

2.3.1.1.2 Mode de fonctionnement

L'Air idéal®3P est un collecteur d'air par impaction. C'est à dire que l'air aspiré passe à travers une série d'orifices et les particules viennent s'impacter sur une surface cible placée sur le trajet du flux d'air. Il permet donc la mise en évidence de germes viables présents dans l'environnement à contrôler par échantillonnage d'un volume d'air donné. L'air est aspiré par une turbine au travers d'une surface criblée comme le décrit la figure n° 1. L'accélération du flux d'air permet l'impaction des germes aéroportés sur la gélose.

Figure n° 1: Schéma présentant le principe de fonctionnement par impaction



Avant tout prélèvement, il faut avoir stérilisé le crible, décontaminé le circuit d'air ainsi que la partie extérieure. Nous mettons l'appareil sous tension et nous choisissons le volume du prélèvement. Nous enlevons alors la protection pour placer la boîte de Pétri munie de son couvercle entre les clips de fixation. Nous ôtons son couvercle puis vissons le crible de prélèvement. Il faut alors mettre en route le prélèvement. À la fin de celui-ci, nous dévissons le crible de prélèvement (photographie n° 13) pour replacer le couvercle non contaminé sur la boîte de Pétri. Plusieurs programmes permettent de réaliser des prélèvements différés ou bien séquencés. La boîte de Pétri peut alors être analysée.

Photographie n° 12: Présentation de l'Air idéal® 3P. Vue de la face avant montrant l'orifice d'aspiration, les lamelles de fixation et le capot de prélèvement



Photographie n° 13: Vue rapprochée du crible, échelle 1 :3



2.3.1.1.3 Mise en culture du prélèvement et analyse

Matériel :

- Boîtes de gélose ANC extraites de l'Air idéal®3P,
- Étuve.

Méthode :

- Placer les boîtes de gélose à l'étuve à +37 °C pendant 24 puis 48 h,
- Première lecture 24 h puis 72 h après la mise à l'étuve.

Les boîtes doivent être incubées le plus rapidement possible. Après incubation, il faut compter le nombre d'UFC. Une correction statistique suivant la loi de Feller détaillée en annexe n° 3 permet de calculer le nombre probable de germes collectés par boîte. Cette correction traduit le passage aléatoire des germes à travers le cible autrement dit la probabilité que plusieurs germes traversent le même orifice et ne soient comptabilisés comme une seule colonie. Cependant pour un petit nombre d'UFC comptabilisées, cette correction est minime

2.3.1.1.2 La pompe DELUXE 224-PCMTX8

2.3.1.1.2.1 Caractéristiques

La pompe DELUXE est fabriquée par la société anglaise SKC® et commercialisée en France par la société ARELCO. La pompe DELUXE possède un débit réglable de 500 à 4000 ml/min à +/- 5 % le débit initial. Elle s'arrête automatiquement s'il est impossible de maintenir un débit constant sur plus de 20 secondes. Le débitmètre à bille est incorporé. La batterie présente une autonomie de 8 heures. Le modèle testé est la pompe 224-PCMTX8. Il s'agit de la version programmable permettant de réaliser des prélèvements sur 7 jours avec branchement sur secteur. Elle autorise des prélèvements à des températures ambiantes s'échelonnant de -20 à +40 °C et une hygrométrie comprise entre 0 et 95 %.

Photographie n° 14 : La pompe DELUXE, son tuyau, son porte cassette et ses cassettes de prélèvement.



Elle est entièrement programmable pour réaliser des prélèvements différés ou bien séquencés. Un écran à cristaux liquide affiche le temps de fonctionnement effectif. L'autonomie de la batterie diffère quelque peu selon le débit d'aspiration choisi, mais est supérieure à 10 heures dans tous les cas. Le constructeur assure qu'elle est construite dans un matériau extrêmement résistant. Elle est livrée avec une sacoche qui permet de porter la pompe sur soi. Un banc d'étalonnage est également commercialisé afin de pouvoir ajuster soi-même le débit.

2.3.1.1.2.2 Mode de fonctionnement

La pompe située dans le boîtier entraîne un flux d'air provoquant une aspiration à proximité d'une cassette fixée sur son porte cassette. L'air entre par l'orifice de la cassette puis les aérosols aspirés s'impactent sur une membrane filtrante située au fond de la cassette. Il s'agit d'un échantillonnage par impaction. Les cassettes sont des boîtes filtres assemblées en usine afin d'obtenir une étanchéité parfaite de la cassette, une absence de contamination du filtre et un gain de temps dans la préparation du prélèvement.

Pour débuter un prélèvement, il faut avant tout s'assurer que le tuyau est correctement connecté à la pompe. Ensuite, nous fixons la cassette de prélèvement sur le porte cassette. Il est nécessaire d'ôter le bouchon de la cassette à usage unique avant de pouvoir la fixer. Il suffit alors d'appuyer sur le bouton « ON » puis de refermer la grille plastique de protection à l'aide d'un tournevis. Le compteur se déclenche sur l'écran LCD. A la fin du temps déterminé pour le prélèvement, nous ouvrons la grille de protection pour appuyer sur le bouton « OFF ». Il faut alors extraire la cassette puis la reboucher.

2.3.1.1.2.3 Mise en culture du prélèvement et analyse

Le traitement des cassettes peut se révéler fastidieux. Aussi dans l'unité de Monsieur Huonic, les cassettes étaient envoyées au Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris pour y être analysées. Étant encore en phase d'essai et pour des raisons de coût, nous avons réalisé nous-même l'analyse des cassettes conformément à la norme NF ISO 16000-17 (février 2009). Le prix de chaque cassette atteint les 5 euros hors taxes. Il nous aurait fallu ajouter les frais d'envoi et de traitement.

Matériel :

- Eau physiologique stérile,
- NaCl,
- Tween 80,
- Pince brucelles,
- Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
- Bec Bunsen et PSM,
- Étuve,
- Autoclave,
- Géloses sang,
- Pipette râteau,
- 2 flacons en verre de 1 000 ml,
- Pots en plastique stérile avec bouchon de 180 ml,
- Gants en latex.

Protocole

- Préparation de la solution saline (8,5g de NaCl / 1 000 ml d'eau distillée),
- Préparation de la solution saline + tween 80 (ou polysorb 80) + 150 µl de tween 80,
- Stériliser les 2 solutions avant ajout de tween à +121°C pendant 15 min,
- Ouvrir la cassette sous le PSM et récupérer le filtre avec une pince bucelle stérile,
- Déposer le filtre dans 5 ml de solution saline stérile +tween 80 puis l'agiter à +37 °C pendant 15 min,
- Après avoir « essoré le filtre », faire des dilutions à 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} du prélèvement,
- Déposer 100 µl de chaque dilution dans 2 boîtes de gélose sang (duplicata) et ensemencer avec une pipette râteau (manipulation près d'un bec bensen),
- Placer les géloses à +37 °C,
- Les lectures sont réalisées quotidiennement pendant 72 h.

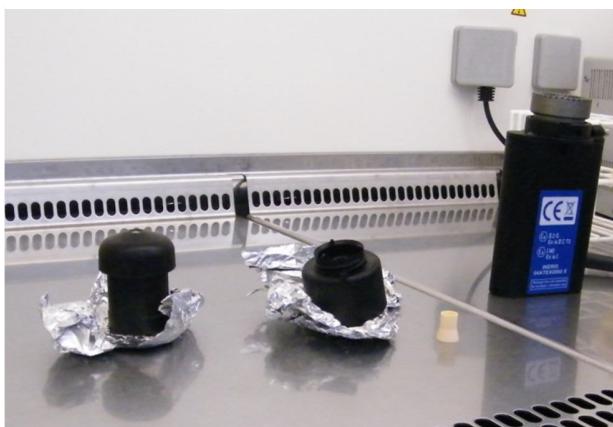
2.3.1.1.3 Le capteur individuel de particules CIP 10 M

2.3.1.1.3.1 Caractéristiques

Le CIP 10 est un petit appareil de prélèvement de poussières en suspension dans l'air. Il a été conçu et développé dans les années 1980 au Centre d'Études et de Recherches de Charbonnage de France (CHERCHAR) désormais Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS). Il a été ensuite étudié à l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Il est fabriqué et commercialisé sous licence INERIS par ARELCO. En 2003, une nouvelle coupelle pour l'échantillonnage de microorganismes a été validée. Le CIP 10 équipé de cette coupelle a été baptisé CIP 10 M. C'est cette dernière version que nous étudierons dans un premier temps. Le CIP 10 présente des caractéristiques particulières intéressantes. Il est de petite

taille, compact, léger, et possède un niveau sonore faible. Son architecture modulaire permet de sélectionner la fraction de l'air désirée pour le prélèvement (photographie n° 15). Cette notion est explicitée au paragraphe 2.3.1.1.3.2. L'aspiration est omnidirectionnelle avec un chapeau protecteur contre la pénétration, indésirable, de grosses particules ou de gouttes d'eau. Enfin, il fonctionne dans toutes les positions.

Photographie n° 15: Le CIP 10 M et sa coupelle métallique ainsi que les différents étages de la tête alvéolaire



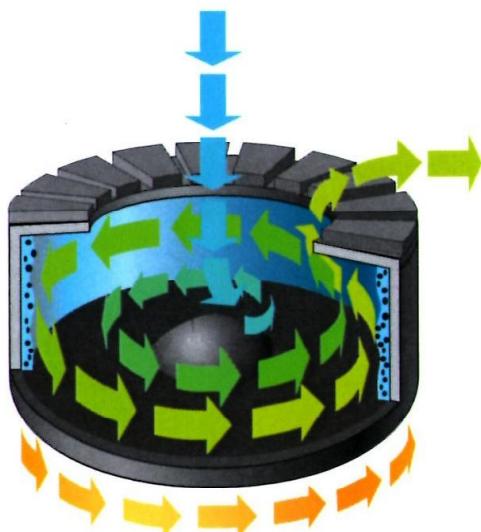
Le CIP pèse environ 300 grammes. Il possède un débit de 10 l/min de grande stabilité. Les vis spéciales de fixation des éléments ferment le CIP avec une grande sécurité. La mise en route et l'arrêt s'opèrent par effet électromagnétique. Une diode témoin du bon fonctionnement est présente sur le carter. L'autonomie annoncée dépasse les 40 heures. L'étalonnage est réalisé par le fabricant sur un banc d'étalonnage à pertes de charge compensées. Enfin le CIP 10 M, tout comme le CIP 10, offre la possibilité de travailler sur des fractions particulières des aérosols contenus dans l'air.

2.3.1.1.3.2 Mode de fonctionnement

Le CIP 10 M se présente sous la forme d'un bloc comportant dans sa partie supérieure une coupelle rotative de prélèvement des particules sélectionnées. Dans sa partie inférieure, le boîtier plat renferme les organes de fonctionnement tels que le moteur, les batteries qui actionnent le moteur, et le circuit électronique de régulation commandant la vitesse du moteur.

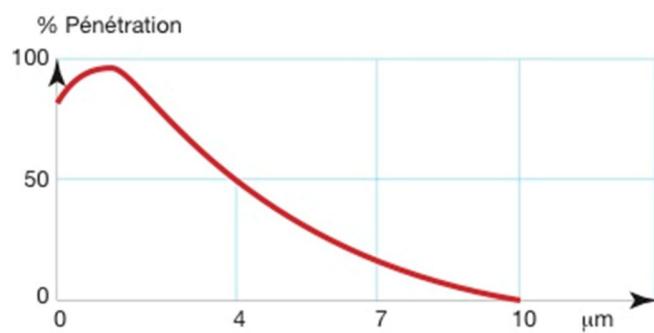
Le CIP 10 M est un collecteur d'aérosols par « impingement ». Cette technique consiste à provoquer un contact entre le flux d'air et un liquide de collecte. Le CIP 10 M comporte une coupelle rotative d'échantillonnage pour micro-organismes contenant le milieu liquide BHI. Cette coupelle est montée sur l'arbre du moteur tournant à grande vitesse à l'intérieur d'une enceinte comportant une entrée d'air axiale et une sortie d'air tangentielle. Le moteur actionne la rotation de la coupelle qui génère par la suite le débit d'air par effet ventilateur et assure la captation de la fraction d'air total (figure n° 2). L'air est ainsi aspiré par une fente omnidirectionnelle d'échantillonnage, formée par le corps de la buse. Il suit ensuite un circuit jusqu'à la coupelle rotative. Le flux d'air est amené vers le liquide de collecte grâce à une dépression créée par le frottement de l'air sur les faces verticales du liquide et sur ses autres faces. Un mouvement hélicoïdal est créé par le flux d'air aspiré pour déposer en douceur sur le fluide, les cellules vivantes et garantir leur viabilité.

Figure n° 2: Schéma présentant le principe de fonctionnement de la coupelle rotative du CIP 10M (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO)



massique des particules inhalées pénétrant au-delà du larynx. La fraction alvéolaire est la fraction massique des particules inhalées qui pénètrent dans les voies aériennes non ciliées (figure n° 3). La sélection des particules respirables alvéolaires est réalisée par un passage dans une mousse de polyuréthane de grade 45 (45 pores par pouce linéaire) suivie d'une filtration sélective par une autre mousse de même grade (figures n° 4 et n° 5). Les mousses sélectrices portent un nom différent (sélecteur et impacteur) du fait de leurs différences de formes. Cependant leur rôle est strictement le même.

Figure n° 3: Schéma présentant la répartition des particules de la fraction alvéolaire selon leur taille. (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO, page 8) Le pourcentage de pénétration traduit la probabilité de retrouver une particule d'un diamètre donnée au sein des alvéoles pulmonaires



Au-dessus de la coupelle rotative, il est possible de fixer des têtes d'échantillonnage différentes contenant des filtres qui permettent d'échantillonner une fraction d'air déterminée. Selon la norme ISO 7708 :1996, il existe une variabilité interindividuelle importante quant à la probabilité d'inhalation, de dépôt, de réaction au dépôt et d'élimination des particules. C'est-à-dire que placés dans les mêmes conditions, deux individus peuvent interagir différemment devant les aérosols. Néanmoins, il est possible de définir des conventions pour l'échantillonnage sélectif en taille des particules en suspension dans l'air. Ainsi, il existe une relation entre le diamètre aérodynamique et les fractions mesurées approchant les fractions pénétrant dans les régions de l'appareil respiratoire. Des modèles mathématiques modélisent le transport des aérosols dans les poumons (Moussa, 2009). Les particules totales sont toutes les particules en suspension dans un volume d'air donné. Ainsi la fraction inhalable est la fraction massique des particules totales en suspension dans l'air inhalé par le nez et par la bouche. La fraction thoracique est la fraction

Figure n° 4: Schéma des éléments composant la tête alvéolaire d'un CIP (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO, page 8)

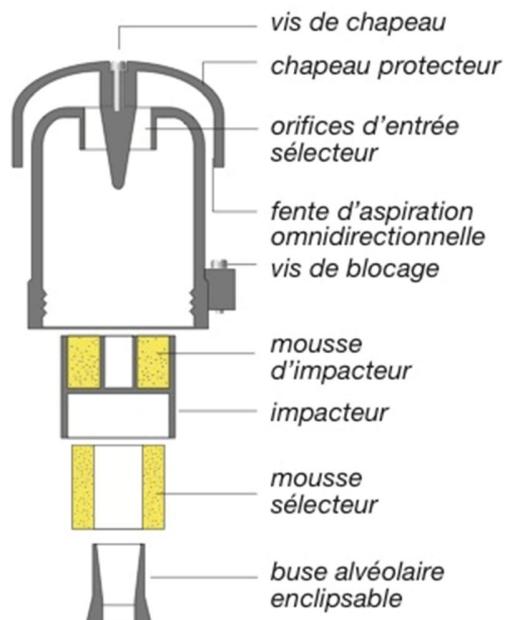
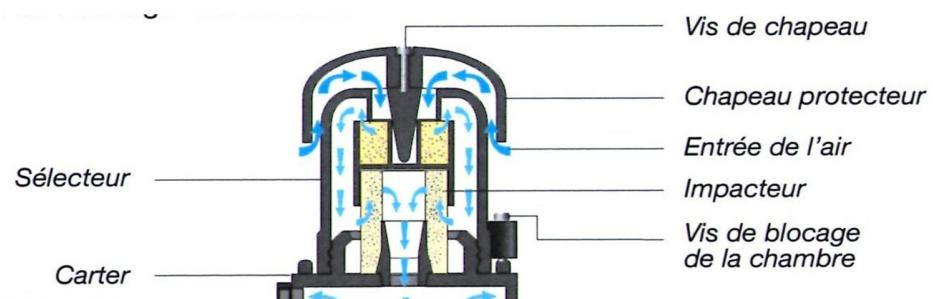


Figure n° 5: Schéma présentant trajet de l'air dans le CIP 10 R (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO, page 8)



Le CIP 10 peut également prélever la poussière totale. Pour cela, il faut d'utiliser une tête alvéolaire dont on ne conservera que le carter et la buse. Ainsi, l'ensemble des particules en suspension dans l'air, y compris les sédimentables peut pénétrer dans le CIP 10. En outre, le CIP 10 M permet d'échantillonner les fractions thoraciques et inhalables. Il convient de se fournir les têtes appropriées. Pour débuter nos expériences, il nous a paru judicieux de travailler sur la fraction alvéolaire de l'air puisque nous pensions que la bactérie *Rhodococcus equi* pourrait être véhiculée par des particules alvéolaires, du moins pour la fraction qui serait probablement pathogène, c'est à dire capable d'atteindre les voies pulmonaires inférieures et notamment les alvéoles. La courbe de la fraction alvéolaire ci-dessus montre que la grande majorité des particules de cette fraction ont une taille inférieure à 7 µm (figure n° 3). Nous avons donc choisi le modèle CIP 10 MR.

2.3.1.1.3.3 Mise en culture du prélèvement et analyse

Après la phase de prélèvement, le CIP 10 M est transporté au laboratoire puis le contenu de la coupelle est déposé dans un tube stérile sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) et ce après avoir noté le volume récolté. Au début de cette phase de recherche et développement, nous avons choisi de travailler sous le poste de sécurité microbiologique pour procéder aux manipulations de la coupelle rotative du CIP. En effet nous avons voulu nous prémunir d'une éventuelle contamination. Nous avons développé le protocole suivant afin de mettre en culture le milieu BHI contenant les aérosols recueillis :

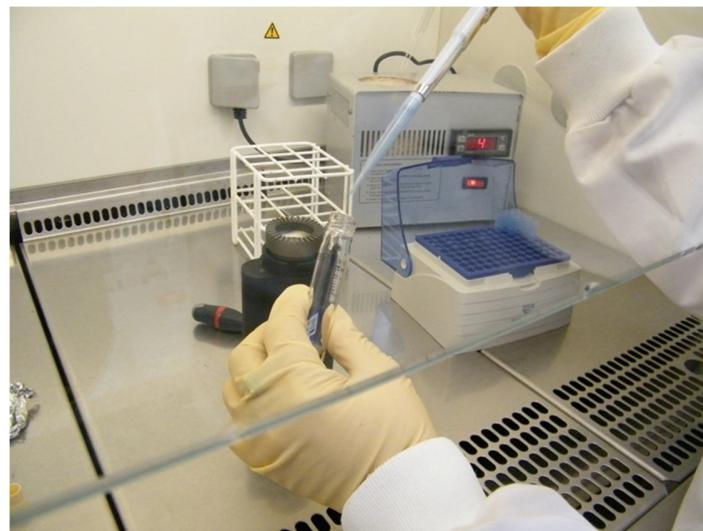
Matériel :

- Pipettes graduées, pipettes Pasteur pipette râteau et pipeteur automatique,
- Petits Tubes stériles en plastique, bouchons et portoir,
- Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
- Milieu BHI et Gélose ANC + 5 % de sang de mouton,
- Bec Bunsen et PSM,
- Étuve,
- Gants en latex.

Méthode :

- Récupérer le liquide dans la coupelle. Mesurer le volume à l'aide d'une pipette graduée et le transférer dans un petit tube en plastique stérile à boucher (photographie n° 16),
- Réaliser une dilution à 10^{-1} dans un petit tube en plastique stérile (le plus souvent 100 µl de liquide dans 900 µl de BHI),
- Réaliser un étalement à partir de 100 µl à l'aide d'une pipette râteau sur gélose ANC + 5 % de sang de mouton pour chaque dilution (0 et -1),
- Incuber 24 h à 48 h à + 37 °C.

Photographie n°16: Prélèvement du BHI contenant les bioaérosols. Cette étape se réalise sous le poste de sécurité microbiologique



2.3.1.2 Étude de sélection d'un appareil

2.3.1.2.1 Étude comparative du CIP 10MR et de l'Air idéal®3P

2.3.1.2.1.1 En extérieur

Cette expérience est l'occasion de comparer les résultats obtenus par deux appareils de mesures différents dans des conditions strictement identiques d'utilisation. Elle a eu lieu le 2 septembre 2010 au centre de la parcelle contaminée en herbe. Pour prendre en considération des expositions différentes, nous avons construit une potence en bois sur laquelle il est possible de fixer le CIP 10 MR à deux hauteurs différentes : 15 cm correspondant au « port de tête bas » d'un poulain et 1,15 m correspondant au « port de tête neutre » d'un poulain de 4 mois. Nous avons également tenté cette expérience pour différents temps de prélèvements afin de pouvoir comparer les quantités de *Rhodococcus equi* recueillies. Enfin un obstacle supplémentaire vient s'ajouter puisque la coupelle rotative du CIP 10 MR est remplie d'un milieu liquide susceptible de s'évaporer ; nous avons donc veillé à quantifier le volume exact restant dans la coupelle au terme de chaque essai. Nous avons donc suivi cette évaporation du milieu BHI pour des temps de collecte différents.

Pour chaque essai, les conditions météorologiques ont été relevées (tableau n° 1). Compte tenu des débits d'aspiration différents entre les deux appareils, les mesures avec le CIP 10MR ont été réalisées avec l'appareil fixé à une potence tandis que l'Air idéal®3P a été tenu grâce aux

poignées prévues à cet effet (photographies n° 17 et n° 18). De plus, l'aspiration du CIP 10 MR est omnidirectionnelle tandis que celle de l'Air idéal®3P se fait à travers un crible verticale de manière unidirectionnelle. Nous avons donc choisi d'orienter l'Air idéal®3P face au vent. Pour éviter une contamination lors d'un changement de parcelle, les pieds de la potence ont été désinfectés avec une solution d'Argospray® dont la composition est présentée en annexe n° 4. Le débit d'aspiration du CIP 10 MR est de 10 l/min alors que celui de l'Air idéal®3P est de 100 l/min ; le temps de collecte avec le CIP est donc 10 fois plus long pour un volume d'air donné. La quantité de milieu BHI introduit dans la coupelle métallique du CIP est de 3 ml.

Tableau n° 1: Correspondance entre les volumes d'air prélevés et les temps de collecte respectifs à chaque appareil.

		Conditions climatiques relevées	Temps de collecte avec le CIP10 MR (min)	Temps de collecte avec l'Air idéal®3P (min)
Volumes d'air récoltés (l)	100	T=24,5 °C Vent Est Sud-est Ensoleillé	10	1
	300	T=23,0 °C Vent Est Nord-est Ensoleillé	30	3
	600	T=23,0 °C Vent Nord Nord-est Ensoleillé	60	6

L'utilisation simultanée de deux CIP 10 MR à deux hauteurs différentes permettait d'étudier les concentrations respectives en *Rhodococcus equi* dans l'air selon la hauteur de prélèvement (tableau n° 3). Parallèlement, cette expérience démontre que l'augmentation du temps de prélèvement diminue le volume recueilli par évaporation mais que cette diminution n'est pas préjudiciable puisque nous récupérons encore 1,7 ml de BHI en moyenne après 60 minutes, ce qui est largement assez pour réaliser l'ensemencement des milieux de culture par la suite tableau n° 2). Ce temps de prélèvement et donc le volume d'air collectés peuvent donc encore être augmentés.

Tableau n° 2: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps

Temps de collecte avec le CIP MR (min)	Volume de solution de BHI dans la coupelle rotative (ml)	
	A 1,15 m de hauteur	A 15 cm de hauteur
10	2,1	2,2
30	2,1	2,1
60	1,6	1,8

Photographie n° 17: Les prélevements en cours. L'Air idéal® 3P collectant l'air à 15 cm du sol et les deux CIP 10 MR, l'un posé au sol et l'autre fixé sur la potence à 1,15 m de hauteur



Photographie n° 18: Fermeture du crible de l'Air idéal® 3P avant le prélèvement à la hauteur de 15 cm

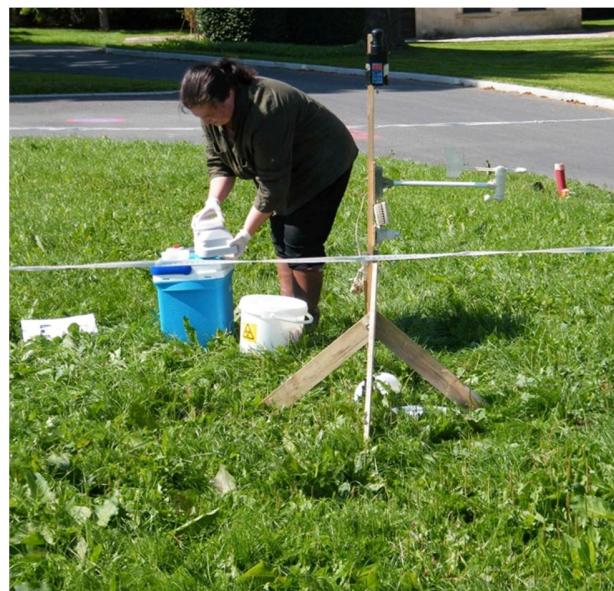


Tableau n° 3: Nombre colonies de Rhodococcus equi (en UFC) comptées sur chaque gélose à l'issue des lectures quotidiennes durant 72 heures en fonction du type d'appareil utilisé, du volume d'air collecté et de la hauteur de prélèvement

Nombre de colonies (UFC)		CIP 10 MR			Air idéal® 3P		
<i>Hauteur du prélèvement (cm)</i>		15		115		15	115
<i>Dilution</i>		10^0		10^{-1}		<i>Pas de dilution possible</i>	
Volume d'air prélevé (l)	100	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0
	600	0	0	0	0	0	0

Les deux appareils ont le même positionnement dans l'espace. En revanche, les débits des appareils étant différents, les prélèvements ne sont pas exactement réalisés à des instants identiques. Cependant, il n'y a eu aucune variation climatique durant cette expérience ce qui vient appuyer la validité de notre essai.

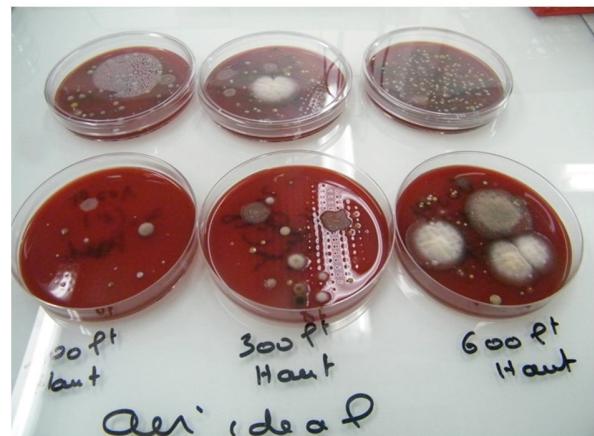
Pour le CIP 10 MR, nous avons réalisé des dilutions à 10^{-1} . Ces dilutions permettaient d'obtenir une meilleure lisibilité si les géloses à 10^0 contenaient trop de colonies. Enfin, ces dilutions sont susceptibles de mettre en évidence un phénomène d'inhibition dans le cas où la compétition avec d'autres bactéries serait trop importante dans la gélose à 10^0 . C'est un des avantages du CIP 10 MR.

Les photographies n° 19 et n° 20 présentent les résultats obtenus après 72 heures de culture pour les 3 volumes collectés pour chaque appareil.

Photographie n° 19: Résultats obtenus avec le CIP 10 MR après 72 heures de culture pour les 3 volumes collectés



Photographie n° 20: Résultats obtenus avec l'Air idéal®3P après 72 heures de culture pour les 3 volumes collectés



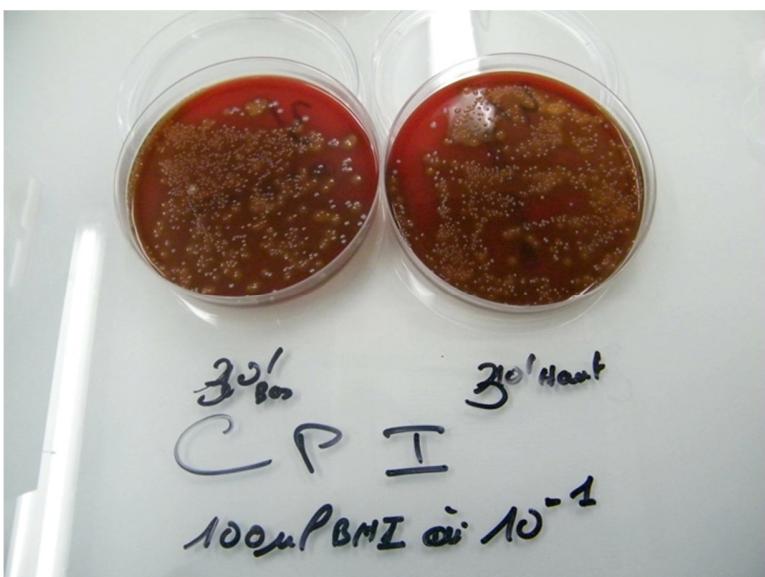
Cette première expérience n'a pas permis de mettre en évidence la présence de *Rhodococcus equi* dans les prélèvements d'air récoltés. Pourtant les conditions météorologiques y étaient plutôt favorables avec un temps sec, ensoleillé, une température à l'ombre de +25 °C. Plusieurs hypothèses permettent d'apporter des éléments d'explication: un protocole inadapté, une erreur dans le protocole, une trop faible contamination initiale, un temps de prélèvement trop court et donc un volume d'air récolté trop faible, de trop faibles quantité de poussières en suspension, une absence normale de *Rhodococcus equi* dans l'air, ou alors un milieu non confiné responsable d'une trop grande diffusion de *Rhodococcus equi*. Enfin, nous pouvons penser que la mise en suspension de la bactérie dans l'air a fait défaut du fait de l'absence de vent ou d'animaux en mouvement sur la parcelle.

Les performances d'un échantillonneur d'aérosol dépendent de sa capacité à collecter les micro-organismes présents dans l'air sans compromettre leur viabilité lors de l'impaction sur la gélose. Cette propriété ne peut être obtenue qu'au moyen d'un compromis entre une vitesse d'aspiration suffisamment élevée permettant une collecte d'air efficace et une vitesse d'impaction suffisamment faible garantissant la revivification des germes. L'inefficacité d'un collecteur d'air peut être due soit à un défaut de collecte des particules contenant les micro-organismes (pertes ou rejets), soit à une inactivation des micro-organismes lors de l'impact sur la surface cible.

La société Biomérieux assure avoir soumis l'air idéal®3P au test de la capacité de collecte et revivification d'un mélange de *Bacillus subtilis* (indicateur de référence de la perte physique) et de *Staphylococcus epidermidis* (indicateur de référence de la perte biologique). Le ratio *S. epidermidis* / *B. subtilis* est alors calculé puis comparé au ratio obtenu avec l'échantillonneur à membrane filtrante qui constitue la référence (Manuel d'utilisation de l'air idéal®3P, Biomérieux, REF 96307, version E 03/2008, page 2-4).

Toutefois, il s'avère que la lecture des résultats obtenus avec l'air idéal®3P est fortement compliquée par la présence de moisissures recouvrant une grande partie des boîtes de gélose (photographie n° 20). De plus la répartition des colonies apparaît comme criblée. Cette répartition correspond au maillage du crible et fait ainsi ressortir un point faible de cet appareil. En effet, cette répartition est un biais pour la quantification de *Rhodococcus equi* puisqu'il y a une perte d'information sur le grillage. Le constructeur assure que ce défaut peut faire l'objet d'une correction statistique selon la loi de Feller (annexe n° 3) qui prend en compte la probabilité que deux colonies se superposent sur le milieu de culture solide après leur passage au travers du crible. Cependant cette correction semble valable uniquement pour plusieurs colonies d'une même bactérie. Qu'en est-il du même phénomène avec deux bactéries différentes ? Qu'en serait-il en extérieur dans un milieu fortement contaminé ? Nous sommes en droit de soulever ce problème en avançant la possibilité d'une inhibition systématique de la croissance de *Rhodococcus equi* lors d'une superposition avec une autre bactérie. De plus les bactéries qui viennent percer la surface du crible sans s'impacter sur la gélose constitue une perte indéniable d'information. Ce sont des inconvénients inhérents au mode de prélèvement par impaction.

Photographie n° 21: Mise en culture de la solution BHI après la phase de prélèvement. Cette image montre l'intérêt des dilutions successives puisque même à la dilution 10⁻¹, la gélose contient encore de très nombreuses colonies.



En revanche, les cultures réalisées avec le CIP 10MR sont parfaitement lisibles. Il n'y a pas de moisissures (photographie n° 21). L'aspect de la mise en culture traduit une répartition homogène grâce à une mise en solution puis un étalement avec la pipette râteau. Un autre avantage du CIP réside dans la possibilité de faire des dilutions successives afin d'améliorer la lisibilité.

Pour augmenter la probabilité d'isoler *Rhodococcus equi*, il faut prélever un volume d'air plus important en augmentant la durée du prélèvement ce qui est possible compte tenu du volume restant dans la coupelle du CIP 10 M après 60 minutes.

2.3.1.2.1.2 En intérieur, en box confiné

Cette étude comparative entre le CIP10 MR et l'air idéal®3P s'est poursuivie dans une deuxième expérience en milieu confiné et contaminé : le box de paille fermé. Une fois de plus, les deux appareils ont été utilisés dans les mêmes conditions, au même endroit en faisant varier le temps de prélèvement et donc le volume d'air collecté et la hauteur de prélèvement (photographie n° 22). La quantité de particules en suspension dans le box a été une autre variable introduite. Cette mise en suspension de particules a été provoquée par l'agitation de la paille.

2.3.1.2.1.2.1 Sans agitation de la paille

Cette expérience a eu lieu le 16 septembre 2010 après avoir contaminé le box le 13 septembre 2010. Les paramètres d'ambiance sont restés constants au cours de l'après-midi avec une température de +22,3 °C et une hygrométrie de 52 %. Le box a été paillé avant sa contamination par les crottins. La potence permettant la fixation des sondes météorologiques et des CIP 10 MR est placée au centre du box. La porte du box est correctement fermée pour reproduire les conditions expérimentales d'un milieu confiné. Dans un premier temps, cette expérience a été réalisée sans agitation de la paille. Les seuls mouvements de personnes dans le box ont été liés à la mise en route et à l'arrêt des appareils.

Photographie n° 22: La potence est installée au centre du box fermé avec les sondes avant le début des prélèvements



Tableau n° 4: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps lors de leur utilisation dans le box sans agitation de la paille

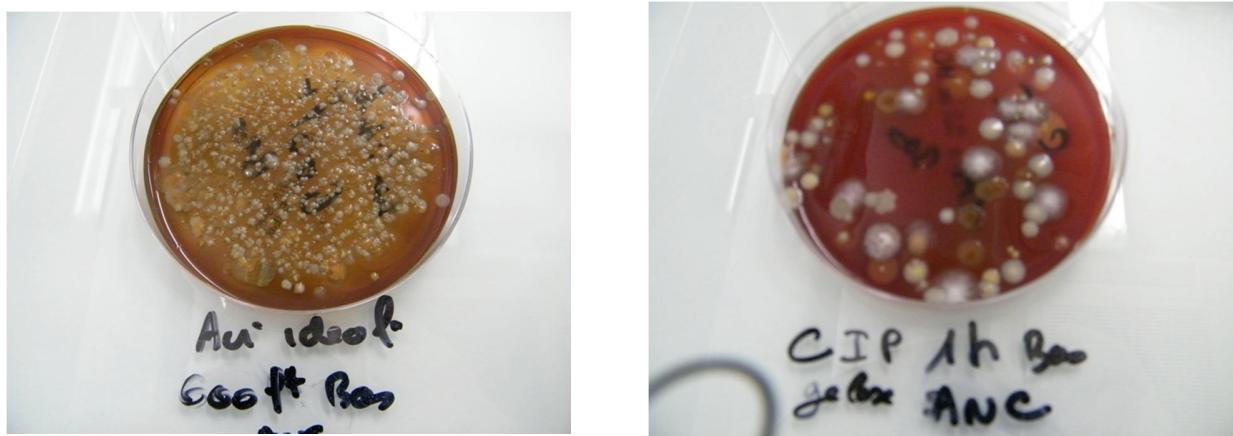
Temps de collecte avec le CIP (min)	Volume de solution restant dans la coupelle rotative (ml)	
	A 1,15m de hauteur	A 15 cm de hauteur
10	2,8	2,8
30	2,6	2,6
60	2,5	2,5

Pour ce qui est du CIP, les volumes recueillis sont très satisfaisants. Pour un temps de prélèvement donné, ils sont supérieurs à ceux obtenus en extérieur ce qui laisse supposer que le phénomène d'évaporation est moins important à l'intérieur (tableau n° 4). Ce phénomène d'évaporation est lié à l'hygrométrie ambiante. Nous n'avions pas encore pu réaliser le relevé de l'hygrométrie pour l'essai en extérieur mais celle-ci était très probablement inférieure à celle mesurée dans le box. Une trop faible hygrométrie peut être préjudiciable au fonctionnement du CIP 10 MR en diminuant le volume résiduel dans la coupelle à la fin du prélèvement. C'est un inconvénient du mode de prélèvement par « impigement » par rapport aux prélèvements par impaction. Nous rappelons que ce volume résiduel collecté à la fin du prélèvement a une importance capitale en ce qui concerne la qualité de l'analyse microbiologique puisqu'un volume trop faible ne permettrait pas de réaliser le nombre de copies souhaitées (duplicata, triplicata...) ou bien les dilutions successives. Il est donc déterminant de trouver un compromis entre un temps de prélèvement suffisamment long pour collecter un volume d'air représentatif et un temps de prélèvement suffisamment court pour pouvoir exploiter un volume intéressant. Dans cette optique, nous pouvons considérer qu'il ne faut absolument pas que ce volume soit inférieur à 0,6 ml dans l'hypothèse où nous souhaitions réaliser des triplicatas ainsi que des dilutions jusqu'à 10^{-1} .

Tableau n° 5: Nombre colonies de Rhodococcus equi (en UFC) comptées sur chaque gélose selon le type d'appareil, le volume d'air collecté et la hauteur de prélèvement.

Nombre de colonies (UFC)		CIP 10MR		Air idéal®3P	
Hauteur de prélèvement (cm)		15	115	15	115
Volume d'air collecté (l)	100	0	0	0	0
	300	0	0	1	0
	600	0	0	0	0

Photographie n° 23: Comparaison des résultats obtenus avec l'air idéal®3P et le CIP 10 MR pour un prélèvement de 600 litres à 15 centimètres du sol après 72 heures d'incubation. La gélose correspondant au CIP 10 MR est à la dilution 10⁰



Dans cette expérience, seule une colonie de *Rhodococcus equi* a été mise en évidence par l'air idéal®3P (tableau n° 5). Il est étonnant de dénombrer une colonie de *Rhodococcus equi* pour un échantillon de 300 l mais pas dans le volume supérieur de 600 l. Nous retrouvons l'aspect criblé sur les géloses pour tous les prélèvements réalisés avec cet appareil. Pour le CIP, seules de rares colonies d'entérocoques ont été observées (photographie n° 23). Cette présence d'entérocoques indique que le processus d'aspiration a bien fonctionné puisqu'on les retrouve normalement dans l'air. Pour cette expérience, nous n'avons pas effectué les dilutions successives pour le CIP 10 MR. Les géloses pour la dilution 10⁰ étaient tout à fait lisibles.

Nous avons donc voulu comparer cette situation à une situation où la paille serait agitée dans le box. Il y aurait alors davantage de particules mises en suspension et donc potentiellement des aérosols plus nombreux.

2.3.1.2.1.2.2 Avec agitation de la paille

La même expérience a été reproduite le 30 septembre 2010 mais avec agitation de la paille cette fois-ci. La température était de +16,8 °C et l'hygrométrie de 62 %. Nous avons provoqué une mise en suspension des particules en agitant la paille autour de la potence. Une personne a donc marché autour de la potence pendant toute la durée de chaque prélèvement afin de mettre la paille en agitation tel qu'un cheval pourrait le faire dans son box paillé.

Tableau n° 6: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps lors de leur utilisation dans le box avec agitation de la paille

Temps de collecte avec le CIP (min)	Volume de solution restant dans la coupelle rotative (ml)	
	A 1,15 m de hauteur	A 15 cm de hauteur
10	2,8	2,8
30	2,7	2,7
60	2,6	2,6

De nouveau nous avons relevé les volumes obtenus dans la coupelle rotative après prélèvement (tableau n° 6). Ils sont voisins de ceux notés lors de l'expérience précédente en milieu confiné sans agitation (tableau n° 4). Ils sont quelque peu supérieurs ce qui peut s'expliquer par une hygrométrie plus élevée dans cette dernière expérience, 62 % contre 52 % auparavant.

Tableau n° 7: Nombre colonies de Rhodococcus equi (en UFC) comptées sur chaque gélose selon le type d'appareil, le volume d'air collecté et la hauteur de prélèvement.

Nombre de colonies (UFC)		CIP 10 MR		Air idéal®3P	
Hauteur de prélèvement (cm)		15	115	15	115
Volume d'air collecté (l)	100	0	0	2	1
	300	0	0	2	1
	600	3	0	2	1

Tout d'abord, ces résultats sont globalement cohérents puisque l'on retrouve, à un volume d'air collecté égal, davantage de colonies de *Rhodococcus equi* dans les essais avec agitation (tableau n° 7). Cela suggère le rôle primordial des poussières dans l'aérosolisation de *Rhodococcus equi*. En ce qui concerne la hauteur, nous retrouvons systématiquement davantage de colonies de *Rhodococcus equi* pour les prélèvements effectués à proximité du sol que pour ceux réalisés en hauteur. La proximité de la source de contamination semble donc jouer un rôle. Il serait intéressant de connaître la répartition théorique des particules selon la hauteur.

Pour le CIP 10 MR, nous avons obtenu pour la première fois du *Rhodococcus equi*. Nous avons ainsi compté 3 UFC pour le prélèvement le plus proche du sol pour le plus gros volume d'air collecté. La concentration en *Rhodococcus equi* mesurée avec le CIP est donc de 5 UFC/m³ de poussières alvéolaires de l'air. Le mode de calcul est disponible en annexe n° 5 et un exemple est présenté au paragraphe 2.3.1.4.1. Bien que les valeurs mesurées pour les autres prélèvements soient nulles, il apparaît cohérent de dénombrer davantage dans ce dernier cas où finalement l'exposition du CIP MR est maximale.

En revanche, pour l'air idéal®3P, quel que soit le volume d'air collecté, nous obtenons toujours le même nombre de colonie de *Rhodococcus equi*. Cela signifie que nous dénombrons autant de colonies pour un volume d'air collecté 6 fois plus important. Cette incohérence pourrait entre autres s'expliquer par un phénomène de superposition des bactéries dû au mode de prélèvement par impaction. De plus la qualité de mise en culture n'est pas en faveur de l'utilisation de l'air idéal®3P puisque que nous sommes confrontés, de manière inconstante mais récurrente, à l'apparition de moisissures qui compromettent la lecture des géloses. En effet, la taille des trous du crible de l'air idéal®3P est de 6 mm de diamètre, ce qui peut autoriser le passage de moisissure comme *Candida* de 500 µm de diamètre.

Enfin, nous avons constaté que l'air idéal®3P a permis de collecter en tout dans cette expérience 3 fois plus de colonies de *Rhodococcus equi* que le CIP 10 MR. Ayant fait ce constat, il ne faut pas oublier que l'air idéal®3P collecte les bactéries contenues dans la totalité de l'air alors que le CIP 10 MR ne dénombre lui uniquement les bactéries contenue dans la fraction alvéolaire de l'air, c'est à dire les particules de taille inférieure à 7 µm. Il serait intéressant par la suite de dénombrer les colonies de *Rhodococcus equi* contenues dans la fraction alvéolaire et celles dénombrées dans l'air total en utilisant simultanément un CIP 10 MR et un CIP 10M.

2.3.1.2.2 Essais complémentaires avec la pompe DELUXE

2.3.1.2.2.1 En extérieur

Nous allons maintenant évaluer les performances de la pompe Deluxe. Elle possède un débit d'aspiration modulable compris entre 0,5 l/min et 4 l/min. Elle a été étalonnée sur le débit d'aspiration de 2 l/min à l'ANSES Ploufragan dans l'unité dans laquelle travaille Monsieur Didier Huonnic. Cette valeur apparaît comme un compromis entre un débit d'aspiration trop faible qui allongerait le temps de collecte et une valeur trop élevée qui pourrait être tenu responsable d'un impact trop violent sur la membrane filtre en polyuréthane et donc d'une mise en culture infructueuse.

Afin de nous placer dans les conditions les plus favorables à la récolte de *Rhodococcus equi*, nous avons placé l'appareil dans les conditions où nous supposons que la concentration en *Rhodococcus equi* serait la plus importante. Ainsi si les parcelles en terre et en herbe sont contaminées de manière similaire, la parcelle en terre nous paraissait être un milieu plus propice pour la mise en suspension des aérosols au vu de la poussière qui peut plus facilement s'en dégager à la faveur de conditions météorologiques particulières, c'est-à-dire la présence de vent et une hygrométrie faible. Pour cette raison, nous ne pouvons parler d'une comparaison rigoureuse puisque les performances du CIP 10 MR et de l'Air idéal®3P ont été évaluées sur la parcelle en herbe auparavant. Toutefois nous pouvons accorder un certain crédit aux résultats de cette expérience avec la pompe Deluxe car les conditions environnementales ne peuvent être que favorables ou bien sans effet sur la présence d'aérosols dans l'air au-dessus de cette parcelle.

Cet essai a donc eu lieu le 11 octobre 2010 sur la parcelle contaminée, en terre et avec la pompe Deluxe posée au sol. Nous avons pu réaliser l'analyse des prélèvements en laboratoire conformément au protocole décrit par le document NF ISO 16000-17 (page 5 à 7). Pour le premier essai, la pompe Deluxe a été positionnée en position basse au centre de la parcelle avec l'entrée de la cassette d'aspiration située à 15 cm du sol. Les boîtes filtres utilisées étaient des cassettes transparentes de 37 mm de diamètre contenant un filtre MCE 0,8 µm Nano Neat CR™. Étant donné le débit d'aspiration et donc le temps de prélèvement important, nous avons réalisé un seul prélèvement d'une durée de deux heures correspondant à un volume de 240 l. Nous avons choisi ce volume car il nous paraissait être un juste intermédiaire entre les volumes d'air collectés précédemment avec les deux autres appareils étudiés. Lors de ce prélèvement, la température était de +20,7 °C, l'hygrométrie de 47 % et la vitesse du vent de 3 m/s. Le protocole d'analyse microbiologique du filtre permettant une mise en solution des éléments contenus sur le filtre, nous avons réalisé des dilutions successives afin d'assurer une meilleure lisibilité des boîtes dans le cas où celle à la dilution 10^0 serait trop chargée. Pour accroître la représentativité, nous avons réalisé des duplicates pour chaque dilution (tableau n° 8).

Tableau n° 8: Nombre de colonies de *Rhodococcus equi* (UFC) comptées sur les géloses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicate

Dilutions prélèvement	Duplicata 1	Duplicata 2
10^0	0	0
10^{-1}	0	0
10^{-2}	0	0
10^{-3}	0	0

Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de *Rhodococcus equi* dans ces conditions expérimentales. Toutefois nous avons souhaité poursuivre l'évaluation des performances de cet appareil. Ainsi pour augmenter la probabilité d'isoler *Rhodococcus equi* dans l'air avec cet appareil, nous avions la possibilité d'augmenter le volume d'air collecté ou bien de travailler dans un milieu confiné. Nous avons donc répété un essai avec la pompe Deluxe mais cette fois-ci dans le box paillé fermé.

2.3.1.2.2.2 En intérieur, en box confiné

2.3.1.2.2.2.1 Sans agitation de la paille

Ce deuxième essai s'est déroulé le 15 octobre 2010 dans le box paillé contaminé. La pompe Deluxe était disposée au sol avec son entrée de la cassette d'aspiration située à 15 cm du sol. Il n'y avait pas d'agitation de la paille. Le volume d'air prélevé était de 240 l. Lors de ce prélèvement, la température était de +17,8 °C, l'hygrométrie de 70 % et la vitesse du vent de 0 m/s. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de *Rhodococcus equi* dans ces conditions expérimentales (tableau n° 9 et photographie n° 24).

*Tableau n° 9: Nombre de colonies de *Rhodococcus equi* (UFC) comptées sur les géloses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicata*

Dilutions du prélèvement	Duplicata 1	Duplicata 2
10°	0	0
10 ⁻¹	0	0
10 ⁻²	0	0
10 ⁻³	0	0

Photographie n° 24: Quelques colonies de staphylocoques obtenues après 72 h de culture. La photographie montre le duplicata n° 1 à la dilution 10⁰



2.3.1.2.2.2.2 Avec agitation de la paille

Pour encore majorer la probabilité d’impaction d’aérosols, et potentiellement de *Rhodococcus equi*, sur le filtre de la pompe Deluxe, nous avons répété cet essai dans le box paillé contaminé fermé mais cette fois-ci en agitant la paille autour de la pompe Deluxe pendant toute la durée du prélèvement. Tout comme précédemment réalisé pour le CIP 10 MR et l’Air idéal®3P, ce mode opératoire avait pour but de provoquer une mise en suspension des aérosols dans l’air environnant la pompe Deluxe.

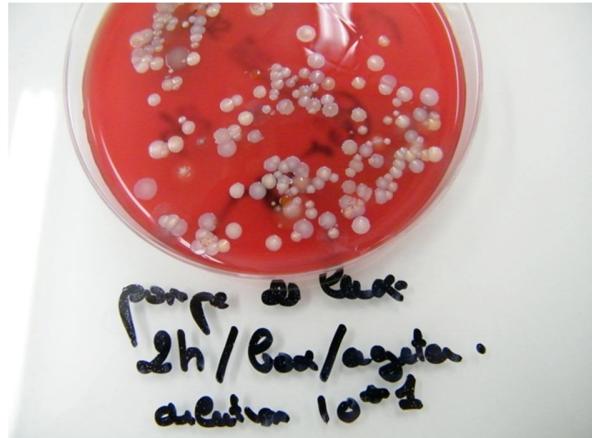
Tableau n° 10: Nombre de colonies de *Rhodococcus equi* (UFC) comptées sur les géloses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicata

Dilutions du prélèvement	Duplicata 1	Duplicata 2
10 ⁰	0	0
10 ⁻¹	0	0
10 ⁻²	0	0
10 ⁻³	0	0

Photographie n° 25: Colonies obtenues après 72 heures de culture sur boîte de gélose ANC. Boîte à la dilution 10⁰



Photographie n° 26: Colonies obtenues après 72 heures de culture sur boîte de gélose ANC. Boîte à la dilution 10⁻¹



Même dans ces conditions, nous n'avons pas mis en évidence de colonie de *Rhodococcus equi* (tableau n° 10). Seules des colonies de Staphylocoques et d'entérocoques ont été observées (photographies n° 25 et n° 26). La comparaison entre l'essai sans agitation et avec agitation de la paille est possible car nous avons travaillé dans les mêmes conditions. Le rapprochement des photographies montre que le nombre de bactéries collectées est bien supérieur lors de l'essai avec agitation de la paille ce qui signifie que le phénomène de mise en suspension des aerosols a bien été efficace. Enfin la comparaison des photographies montre l'amélioration de la lisibilité et donc l'efficacité des dilutions successives réalisées.

Devant les difficultés à détecter *Rhodococcus equi* avec cet appareil alors que nous travaillons avec un volume prélevé important en terrain contaminé, à proximité du sol et dans un environnement contenant des particules en suspension, nous écarterons très probablement l'utilisation de cet appareil. De plus les cassettes filtres sont des consommables extrêmement coûteux et le protocole d'analyse bactériologique fastidieux à mettre en œuvre. En effet, la membrane se déchire facilement lors de la manipulation, tout particulièrement lors de son essorage.

2.3.1.3 Comparaison synthétique des appareils et choix de l'un d'entre eux

Au vu des caractéristiques intrinsèques de chaque appareil et des enseignements que nous avons tirés de nos différents essais, nous avons dressé un tableau comparatif des appareils pour les points clés intervenant dans nos choix (tableau n° 11). Très peu d'articles ont étudié les performances de différents collecteurs d'aérosols pour établir une hiérarchie entre les modes prélèvement en ce qui concerne leur capacité à détecter les bactéries dans l'air (Duchaine *et al.*, 2001; Terzieva *et al.*, 1996). Cependant, une étude a comparé les performances d'appareils dont les modes prélèvement sont différents pour détecter la concentration de la bactérie *Legionella pneumophila* dans l'air (Deloge-Abarkan *et al.*, 2007). Elle conclut à la supériorité du mode de prélèvement par impingement par rapport à l'impaction sur support solide ou bien la filtration. Cette supériorité réside dans un nombre de bactéries détectées plus important. Cette différence tient notamment au fait que le mode de collecte par impaction provoque des dommages aux bactéries recueillies portant ensuite préjudice à leur mis en culture (Stewart *et al.*, 1995).

Comparé à la pompe Deluxe et à l'Air idéal®3P, le CIP est l'appareil qui offre l'encombrement, le poids et le niveau sonore minimaux. De plus le CIP permet soit une quantification des bactéries en aérosols par « impigement » dans la configuration CIP 10 M, soit une quantification de la concentration massique de poussières dans la configuration CIP 10. Nous reviendrons ultérieurement sur cette fonctionnalité dans la partie consacrée à la quantification des poussières. En outre, les différentes configurations du CIP permettent la fixation de têtes spécifiques à une fraction donnée de l'air. Ce point, tout à fait original, est capital pour pouvoir déterminer dans quelle fraction de l'air se trouve la bactérie. Les autres systèmes de collecte d'air n'offre pas cette possibilité. À résultat égal, le coût de prélèvement unitaire est un facteur important à prendre en considération et ce tout particulièrement pour une étude dans laquelle ils pourraient être très nombreux. Aussi, le coût d'un prélèvement effectué avec la pompe Deluxe est prohibitif.

Tableau n°11 : Confrontation des appareils étudiés selon les points qui ont retenu notre attention

	Air idéal® 3P PCTX8	Pompe Deluxe 224- CIP
Taille (mm)	128x146x208	49x119x130 170x70x45
Poids (g)	3 000	1500 300
Niveau sonore (dB)	Élevé	Modéré Faible
Fixation	Poignées, difficile de l'installer sur un cheval	Sacoche Baudrier ou potence
Débit d'aspiration	Fixe, étalonné à 100 l/min	Variable, à étalonner Entre 0,5 l/min et 4 l/min Possibilité d'acheter un banc pour l'étalonnage
Filtration de l'air	Pas de filtration de l'air	Sélection selon le filtre contenu dans la cassette
Fonction	Bactéries	Bactéries et poussières

	Air idéal® 3P	Pompe Deluxe 24-P PCTX8	CIP
Dépendance site prélevement/moteur	Milieu de prélevement solidaire du moteur	Milieu de prélevement raccordé par un tube de plastique flexible au moteur	Milieu de prélevement solidaire du corps du CIP
Programmation des prélevements	Programmable. Prélevements séquencés ou différés	Programmable. Prélevements séquencés ou différés	Non programmable
Position lors du fonctionnement	Fonctionne dans toutes les positions	Le moteur doit être positionné à la verticale	Fonctionne dans toutes les positions
Coût unitaire de prélevement (consommable et analyses, hors main d'œuvre)	Faible (estimé à 1 euro)	Élevé (environ 7 euros)	Faible (estimé à 1 euro)
Contamination par moisissures	Très importante	Absente	Absente
Mise en route	Interrupteur	Avec un tournevis. Fiable	Électromagnétique. Fiable
Témoin de fonctionnement	Niveau sonore	Compteur à cristaux liquide (temps de collecte indiqué) Niveau sonore	LED rouge Niveau sonore
Autonomie batterie	5h	>6h	>40h
Type d'aspiration	Aspiration unidirectionnelle	Aspiration omnidirectionnelle	Aspiration omnidirectionnelle

	Air idéal® 3P	Pompe Deluxe 224-PCTX8	CIP
Prix (approximatif en euros)	2 500	1 000	1 500
Lieu de fabrication et du service après-vente	Fabriqué en France SAV à Craponne	SKC SAV Dorset Royaume - Uni	Fabriqué France SAV à Fontenay-sous-Bois
Conditions climatiques de fonctionnement	Fonctionnement possible si Température de 0 à 40°C. Hygrométrie de 0 à 95%	Fonctionnement possible si faible hygrométrie (0 à 95%), de -20 à +40°C	Difficile si très faible hygrométrie car la solution BHI s'évapore. Raccourcir le temps de collecte
Logistique prélevements	Possibilité de faire plusieurs prélevements consécutifs sans retourner au laboratoire	Possibilité de faire plusieurs prélevements consécutifs sans retourner au laboratoire	Retour au laboratoire sous PSM possible mais pas obligatoire
Coût étalonnage	Pas d'étalonnage chez le fabricant mais dans un laboratoire indépendant	Possibilité d'acheter le banc d'étalonnage	400 euros. Retour au fabricant conseillé chaque année
Consommables	Stérilisation du crible à chaque prélevement. Milieux de culture neuf	Cassette neuve pour chaque prélevement	Coupelle à stériliser après chaque prélevement. Mousses rotatives neuves
Mode de récolte des bactéries	Destruction des bactéries très probables lors du choc. Colmatage de la gélose et superposition de bactéries	Impaction. Destruction possible de la bactérie lors du choc contre le filtre. Colmatage possible sur support papier	« Impingement », contact avec un milieu liquide. Peu de destruction et pas de colmatage d'un support
Résistance aux chocs	Coque solide	Non testée. Coque de protection solide	Testée. Matériel solide

Nous avons également comparé la lisibilité des résultats obtenus et nous avons constaté que la lecture des boîtes issues des prélèvements avec l'Air idéal®3P était très souvent compliquée par la présence de moisissures. Cet aspect est rédhibitoire dans le choix d'un appareil de collecte. Il serait envisageable d'utiliser un milieu sélectif ne permettant pas la croissance de moisissures mais encore faut-il qu'il n'inhibe pas la croissance de *Rhodococcus equi* et que le coût unitaire de prélèvement ne devienne pas prohibitif.

En ce qui concerne le débit d'aspiration, il nous a semblé important de choisir un échantillonneur collectant l'air à la même vitesse qu'un poulain. Les poulains généralement touchés sont âgés de 6 semaines à 6 mois. Bien évidemment, la croissance durant cette période augmente la taille des poumons, mais la fréquence respiratoire diminue en parallèle. Aussi nous avons pu estimer des valeurs représentatives de la physiologie pulmonaire pour un individu de cet âge. Le débit respiratoire est fonction du volume respiratoire et de la fréquence respiratoire. Nous avons choisi le volume courant (VC) qui est le volume d'air que le poulain inspire et expire à chaque respiration. Chez le poulain de 3 mois, celui-ci s'élève à environ 1,45 (+/- 0,19) l. (Koterba *et al.*, 1995) contre 500 ml chez un homme adulte. Toutefois, une portion ne participe pas aux échanges gazeux et reste en dehors des alvéoles. Dans le cas où l'infection par *Rhodococcus equi* siège dans les voies respiratoires inférieures, il nous faut donc retrancher cette fraction d'air qui est nommé espace mort anatomique (EMA). Celui-ci est estimé à 0,4 l. En ce qui concerne la fréquence respiratoire (Fr) du poulain, il existe une variabilité inter individuelle. Elle est moins élevée chez un poulain âgé de 4 mois que chez un poulain de 6 semaines. Au vu de la littérature et de nos observations cliniques, nous avons retenu la valeur de 22 mouvements par minute pour un poulain âgé de 3 mois. Ces données nous permettent de calculer la ventilation alvéolaire (\dot{V}_a). On la calcule en appliquant la formule: $\dot{V}_a = Fr \times (VC - EMA)$. Nous estimons donc la ventilation alvéolaire du poulain à 23,1 par minute. Il est donc déterminant que les valeurs d'aspiration d'air des échantillonneurs d'air s'approchent autant que possible de cette valeur afin de s'approcher de l'exposition du poulain pendant la période de prélèvement. En effet, dans le cas où l'appareil de mesure serait porté par le poulain et que ce dernier est en mouvement dans un espace donné, seule une valeur de débit adéquate peut traduire une véritable représentativité de concentrations obtenues en *Rhodococcus equi* dans l'air environnant. En effet, ces mesures sont révélatrices du temps passé dans un espace donné et si l'on s'écarte de cette valeur, il y aura une distorsion de ce rapport. Enfin, ce débit d'aspiration est en lien avec la vitesse d'arrivée de *Rhodococcus equi* dans les voies respiratoires du poulain ou bien sur la surface d'impaction ou le liquide de l'échantillonneur. Un échantillonneur avec un débit d'aspiration élevé augmente la vitesse d'arrivée de *Rhodococcus equi* sur son support cible et le choc en résultant serait tenu responsable de la diminution de viabilité de la bactérie. Le CIP est l'appareil dont le débit d'aspiration est le plus voisin de la ventilation alvéolaire physiologique du poulain. En revanche, la pompe Deluxe affiche une valeur plus de 7 fois inférieure à valeur de référence tandis que l'Air idéal®3P possède un débit d'aspiration plus de 7 fois supérieur à la ventilation pulmonaire du poulain sain.

Pour ce qui est des conditions climatiques de prélèvement, les appareils d'échantillonnage par impaction autorisent une utilisation dans une large plage de températures de pourcentages d'hygrométrie. En revanche, le CIP ne doit pas être utilisé à un pourcentage d'hygrométrie trop faible au risque de voir le volume du liquide contenu dans la coupelle diminuer. Cependant, les essais menés ont permis de montrer que le volume restant était suffisant dans toutes les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons travaillé.

Le mode d'échantillonnage par « impigement » ainsi que ses caractéristiques intrinsèques nous ont convaincu. Nous avons donc privilégié les CIP au détriment de la pompe Deluxe et de l'Air idéal®3P.

2.3.1.4 Étude des concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air selon la fraction prélevée

2.3.1.4.1 En milieu confiné

Afin de poursuivre l'exploration des possibilités du CIP, nous avons réalisé une expérience dans laquelle nous avons comparé la quantité de *Rhodococcus equi* dans l'air selon la fraction de l'air étudiée : air total versus fraction alvéolaire. Ainsi nous pouvons récupérer les bactériaérosols contenus dans l'air total en installant seulement une buse au-dessus de la coupelle rotative. Il s'agit de la configuration CIP 10 M. L'installation d'une mousse sélecteur et impacteur en amont du trajet de l'air aspiré dans le CIP 10 MR permet de ne recueillir que la fraction alvéolaire, c'est à dire les particules de taille inférieure à 7 µm pouvant parvenir jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Il s'agit donc de la fraction que nous suspectons être « pathogène » pour les poulains

Le prêt de deux CIP permet leur utilisation simultanée et donc une étude dans des conditions strictement identiques. Pour maximiser la probabilité de recueillir *Rhodococcus equi*, nous avons choisi d'utiliser le modèle du box paillé dans lequel le CIP est placé au sol et la paille agitée par une personne décrivant des cercles autour du CIP. Nous avons donc disposé les deux CIP 10 M et 10 MR au sol dans le box paillé contaminé. La hauteur de prélèvement est alors de 15 centimètres. La personne a marché autour de la potence pendant toute la durée de prélèvement. Le temps de collecte est de 10 minutes soit un volume d'air de 100 l. Le protocole de mise en culture est identique à celui décrit auparavant. Cependant, pour obtenir une plus grande représentativité, nous avons réalisé des triplicatas pour chaque prélèvement (tableau n° 12). Cette expérience s'est tenue le 6 octobre 2010. La température était de +19 °C et l'hygrométrie ambiante de 60 %.

Tableau n° 12: Nombre de colonies de *Rhodococcus equi* (UFC) comptées sur les boîtes de gélose après 72 heures de culture selon la fraction recueillie et le numéro du triplicata

Nombre de colonies (UFC)	CIP 10 M, fraction totale	CIP 10 MR, fraction alvéolaire
Triplicata 1	1	0
Triplicata 2	1	0
Triplicata 3	1	0

Le volume recueilli dans chacun des deux CIP 10 M était de 2,8 ml à l'issu des 10 minutes de prélèvement ce qui n'a donc posé aucune difficulté pour effectuer des triplicatas. Les résultats obtenus montrent d'une part une bonne répétabilité des prélèvements puisque le nombre de colonies comptées pour chaque triplicata est constant. Nous n'avons pas mis en évidence de colonies de *Rhodococcus equi* sur les géloses correspondant au prélèvement de la fraction alvéolaire. Nous avons donc obtenu un résultat identique à celui de l'essai réalisé dans les mêmes conditions le 30 septembre 2010. En parallèle, nous avons dénombré une colonie de *Rhodococcus equi* sur chaque gélose correspondant au prélèvement de l'air total. Il est cohérent de dénombrer davantage de *Rhodococcus equi* dans l'air total que dans sa fraction alvéolaire. Un calcul permet d'estimer la concentration en *Rhodococcus equi* à 280 UFC/m³ d'air en travaillant sur la fraction totale de l'air. Le mode de calcul présenté ci-dessous a été réalisé selon la norme EN 13098 : 2000 disponible en annexe.

Calcul :

$$C = \frac{\sum C \times V_0}{V_1 (n_1 + 0,1 \times n_2) d \times V_a}$$

Application numérique :

$$C = \frac{3 \times 2,8}{0,1 \times 3 \times 0,1} = 280 \text{ UFC/m}^3$$

2.3.1.4.2 En extérieur, sur la parcelle en terre

Nous avons choisi de répéter cette expérience suivant le même protocole mais en extérieur cette fois-ci. Elle a eu lieu le 12 octobre 2010 sur la parcelle en terre contaminée. Le temps était ensoleillé, la température de +18,5 °C, l'hygrométrie de 43,2 % et la vitesse du vent de 2,3 m/s. Étant donné que cette expérience se déroule en extérieur, il est difficile d'augmenter artificiellement la quantité de particules en suspension dans l'air. La durée de prélèvement a donc été allongée et portée empiriquement à 2 heures. Le volume restant à l'issue du prélèvement est de 1,0 ml pour le CIP 10 M et de 1,5 ml CIP 10 MR.

*Tableau n° 13: Nombre de colonies de *Rhodococcus equi* (UFC) comptées sur les boîtes de gélose selon la fraction recueillie et le numéro du triplicata*

Nombre de colonies (UFC)	CIP 10 M air total	CIP 10 MR, fraction alvéolaire
Triplicata 1	0	0
Triplicata 2	0	0
Triplicata 3	0	0

Au terme de cette expérience, nous n'avons pas détecté de *Rhodococcus equi* que ce soit dans l'air total ou bien sa fraction alvéolaire (tableau n° 13). Cependant nous avons retrouvé des staphylocoques et des entérocoques traduisant le bon fonctionnement du système d'aspiration.

La comparaison des résultats obtenus entre un milieu confiné riche en particules en suspension et un milieu extérieur plus pauvre suggère le rôle important des particules en suspension dans l'air dans l'aérosolisation de *Rhodococcus equi*. Il serait donc intéressant de développer une méthode pour quantifier les poussières totales et alvéolaires en aerosols.

2.3.1.5 Une mesure avec des appareils embarqués révélatrice de l'exposition réelle

2.3.1.5.1 Enseignements des résultats

Dès le début de nos expériences, nous avons souhaité réaliser des prélèvements à deux hauteurs distinctes. La première, à 15 centimètres du sol, correspond au port de tête bas du poulain qui est entre autres observé lorsqu'il s'alimente ou bien en cas de coprophagie. La deuxième position, à 115 centimètres du sol, correspond à la distance entre le sol et les naseaux d'un poulain âgé de 4 mois lorsque son port de tête est neutre. Cette distance a été mesurée sur un poulain de 4 mois autopsié à l'ANSES, et ayant eu une croissance normale. Dans la majorité de nos expériences, nous avons donc mesuré la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air à ces deux hauteurs. Aussi nous avons ensuite additionné le nombre de colonies obtenues pour chaque hauteur et chaque volume et ceux indifféremment du type d'appareil utilisé (CIP 10 MR et air idéal®3P) pour chaque volume d'air collecté. Nous avons donc pris en compte uniquement les expériences où les prélèvements à deux hauteurs avaient été réalisés simultanément (tableau n° 14). Cela concerne les essais menés en extérieur le 2 septembre 2010 et en intérieur le 16 et le 30 septembre 2010.

Tableau n° 14: Colonies de *Rhodococcus equi* dénombrées en fonction de la hauteur de prélèvement et du volume d'air collecté

Nombre de colonies (UFC)		Hauteur du prélèvement	
		15 cm	115 cm
Volume d'air collecté (L)	100	2	1
	300	3	1
	600	5	1
	Total	10	3

Indéniablement, ces résultats montrent que le nombre de colonies de *Rhodococcus equi* à la faible hauteur est plus important que celui compté à une hauteur plus élevée. La proximité avec la source de contamination semble donc déterminante. Face à ce constat, deux hypothèses peuvent être mises en avant. La première serait une diffusion selon un gradient de concentrations autour de la source. Ce modèle suivrait alors une diffusion selon la loi de Fick selon laquelle le flux de diffusion est proportionnel au gradient de concentration. La deuxième hypothèse mettrait en scène le rôle de la diffusion de *Rhodococcus equi* par les poussières grâce à l'aérosolisation.

Les résultats pourraient donc s'expliquer par des concentrations de particules de types « poussières » variables en fonction de la hauteur au sol. Le modèle serait donc ici un gradient de concentrations de particules décroissant avec l'augmentation d'altitude. Nos essais réalisés nous orientent davantage vers cette deuxième hypothèse puisque à une altitude égale par rapport à la source de contamination (par exemple 15 cm), nous avons détecté la présence de *Rhodococcus equi* dans un environnement riche en particules en suspension dans l'air (le box paillé avec agitation de la paille) alors que nous n'avons pas retrouvé de *Rhodococcus equi* en extérieur sur la parcelle en herbe qui est un milieu où la concentration de particules dans l'air est très probablement plus faible. Pour objectiver ce sentiment, une méthode permettant de mesurer la concentration de poussières dans l'air serait déterminante.

2.3.1.5.2 Intérêt de la mise en place d'un baudrier

Comme nous l'avons démontré précédemment, la mesure de la concentration *en Rhodococcus equi* à une hauteur donnée dans l'espace se révèle être une mesure ponctuelle. Elle n'est pas véritablement pertinente pour déterminer l'exposition réelle d'un individu dans son environnement. Afin d'éviter ce type de biais, nous avons décidé de réaliser une mesure embarquée. Nous avons eu l'idée de fixer l'appareil sur le cheval et de le positionner à proximité des naseaux du cheval, porte d'entrée supposée de *Rhodococcus equi* dans l'organisme. Nous pourrions alors obtenir une mesure véritablement environnementale qui reflète l'exposition réelle du cheval dans son milieu. Cette exposition réelle traduit la concentration de *Rhodococcus equi* au prorata du temps passé par le cheval dans un milieu défini. Le postulat en amont est bien évidemment que la probabilité d'inhalation dépend de la position du cheval par rapport à la source de contamination éventuelle. Si un cheval passe plus de temps dans un secteur de la surface totale dont il dispose pour se déplacer, il est donc approprié que cette relation espace-temps soit prise en compte notre mesure : elle traduit l'exposition réelle. Cette idée vient conforter le choix du CIP pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il fallait un échantillonneur dont le débit d'aspiration de l'air soit proche de la valeur physiologique de la ventilation pulmonaire du poulain. Enfin, il est intéressant d'avoir sélectionné un appareil léger, compact, avec un niveau sonore de fonctionnement faible pouvant assurer sa fonction dans toutes les positions afin de pouvoir le fixer sur un individu en mouvement. Nous avons donc développé un modèle de baudrier permettant cette fixation.

2.3.1.5.3 Cahier des charges et conception

La fixation d'un appareil sur la tête de cheval présente de nombreuses contraintes et le baudrier conçu devait répondre à un cahier des charges important. En ce qui concerne l'appareil, il doit être léger, peu encombrant et silencieux pour ne pas perturber le cheval. Un niveau sonore élevé pourrait provoquer une panique chez le cheval et entraîner des dégâts importants. Enfin, l'appareil ne doit pas être sensible aux mouvements du cheval. Seul le CIP présente l'ensemble de ces caractéristiques. Lors de la conception du baudrier pour le CIP, nous avons veillé à certains points spécifiques. Ainsi ce baudrier doit se fixer et s'enlever rapidement sur le licol du cheval et de préférence sur n'importe quel type de licol (photographie n° 28). En effet, il est probable que les élevages ne souhaitent pas partager un même licol par peur légitime d'une contamination. Il doit aussi maintenir fermement le CIP pour que celui-ci ne tombe pas lors des mouvements brusques. En effet, le cheval étant dans une surface donnée, il est libre de pouvoir se déplacer à grande vitesse. De plus, ce baudrier devait être matelassé pour assurer une certaine protection sans pour autant être trop volumineux. Il ne devait pas non plus provoquer une surchauffe de l'appareil ou bien obstruer la sortie d'air du carter ce qui pourrait modifier le débit. Nous avons donc dessiné spécialement ce baudrier qui a été fabriqué artisanalement. Ce modèle baptisé « Rhodopopus » a été confectionné dans une toile très résistante et contenant un mousse de protection dans son épaisseur (photographie n° 27).

Photographie n° 27: Le Rhodopopus après sa confection. Une boucle de plastique permet d'ajuster les lanières au plus près du CIP

Photographie n° 28: Le CIP 10 MR installé dans le Rhodopopus. Il est ensuite fixé au licol par des lanières en cuir attachées dans les passants



2.3.1.6 Premier essai à l'ANSES

2.3.1.6.1 Matériel retenu

Ce premier essai avait pour objectif de vérifier la faisabilité de la fixation d'un CIP 10 MR sur un cheval grâce au « Rhodopopus ». Il permettait de se familiariser avec le protocole et d'en vérifier la maîtrise. Pour des questions de sécurité, nous avons choisi d'effectuer ce premier essai dans une stabulation afin de prévenir tout accident. En effet, nous avons préféré prendre les précautions nécessaires dans le cas où la fixation d'un appareil en fonctionnement sur la tête du cheval provoquerait une réaction de crainte non maîtrisée. Nous voulions ainsi éviter les accidents tels qu'un empalement dans une clôture suite à une course effrénée, une échappée sur la voie publique ou encore une destruction du CIP. Cet espace clos, d'une surface de 30 mètres carrés, avait été récemment paillé. Il n'a pas été contaminé par *Rhodococcus equi*. Cet essai a eu lieu le 23 février 2011 avec la jument nommée Opaline. Le matériel utilisé pour cet essai est décrit ci-dessous :

Matériel :

- Gants non talqués,
 - 2 Tubes stériles contenant 3,0 ml de BHI,
 - Papier aluminium,
 - Autoclave, PSM, Tournevis,
 - CIP 10 MR (CIP 10, coupelle, carter, buse, tête, mousses sélecteur et impacteur) ,
 - Baudrier « Rhodopopus » et ses 2 lanières de cuir,
 - Licol.
-
- Pipettes graduées, pipettes Pasteur et pipeteur automatique,
 - Petits Tubes stériles en plastique et Portoir,
 - Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
 - Géloses ANC + 5% de sang de mouton,
 - Bec Bunsen et PSM,
 - Étuve et autoclave.

2.3.1.6.2 Protocole retenu

Protocole:

Au préalable, la coupelle rotative, le carter ainsi que la tête alvéolaire ont été stérilisés. Nous avons préparé le CIP 10 MR sous le poste de sécurité microbiologique (photographie n° 29). Le CIP 10 MR a été ensuite transporté verticalement jusqu'à la stabulation pour éviter toute perte de milieu liquide BHI. Une fois sur place :

- Démarrer le CIP 10 MR en position verticale à l'aide de l'aimant,
- Une fois la mise en route correctement effectuée, mettre le CIP 10 MR dans le Rhodopopus,
- Fixer alors l'ensemble sur le montant du licol avec les lanières de cuir, la tête alvéolaire orientée vers le bas pour que l'entrée de l'air se fasse au plus près du naseau ipso latéral,
- Une fois le temps de prélèvement écoulé, décrocher le Rhodopopus,
- Arrêter alors le CIP 10 MR au moyen de l'aimant,
- Retourner sous le poste de sécurité microbiologique avec le CIP 10 MR en position verticale,
- Procéder alors à l'ouverture de la tête alvéolaire en étant munis de gants,
- Récupérer le liquide dans la coupelle. Mesurer le volume à l'aide d'une pipette graduée et le transférer dans un petit tube en plastique stérile à boucher (photographie n° 30),
- Réaliser une dilution à 10^{-1} dans un petit tube en plastique stérile (le plus souvent 100 µl de liquide dans 900 µl de BHI),
- Réaliser un étalement à partir de 100 µl à l'aide d'une pipette râteau sur gélose ANC + 5 % de sang de mouton pour chaque dilution (10^0 et 10^{-1}),
- Répéter cette étape deux fois pour obtenir des triplicatas,
- Incuber 24 h à 48 h à + 37 °C.

Lors de la mise en route du CIP 10 MR, nous avons surveillé les réactions de la jument. Celle-ci n'a manifesté aucune forme de crainte ou d'inquiétude lors de la fixation de l'appareil. La masse portée sur le côté du licol n'a pas semblé gêner la jument. En revanche lors de l'orientation du CIP 10 MR la tête alvéolaire vers le bas, un bruit strident s'est dégagé. Aussi pour ne pas effrayer la jument et perturber l'expérience, nous avons décidé de retourner le CIP 10 MR pour orienter la tête vers le haut. La photographie n° 31 montre le positionnement de l'appareil. Ce changement de positionnement par

Photographie n° 29: Le montage de la tête alvéolaire sous le poste de sécurité microbiologique

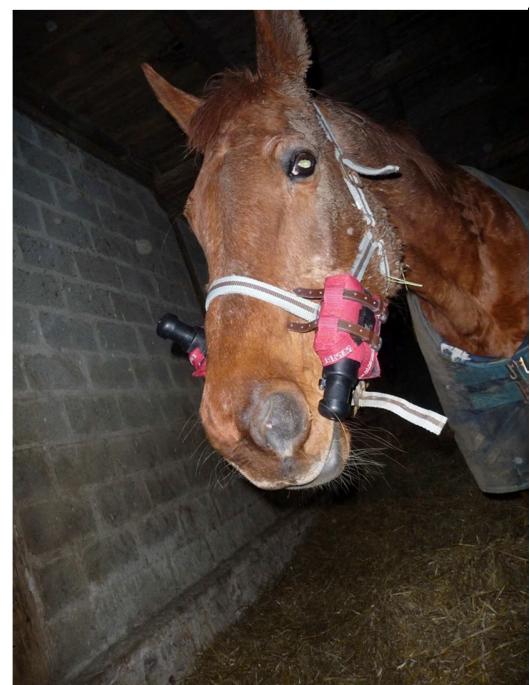


rappor t à celui initialement prévu éloigne très légèrement la tête alvéolaire des naseaux. Toutefois l'aspiration est omnidirectionnelle, la validité du raisonnement ne peut donc être remise en question. Enfin, après la mise en route du CIP 10 MR et lors de sa fixation sur la jument, nous avons constaté qu'un petit volume de BHI s'est écoulé par la sortie tangentielle du l'appareil. De là, nous avons choisi d'abaisser le volume de BHI initialement introduit à 2,5 ml au lieu de 3,0 ml.

Photographie n° 30: De retour au laboratoire, dépôts sur boîtes de gélose ANC et réalisation de triplicatas



Photographie n° 31: Opaline, premier cheval à avoir testé l'appareil. À sa gauche, la position initialement prévue pour le CIP 10 MR. À sa droite, la position finalement adoptée



2.3.1.6.3 Résultats obtenus

Malgré la perte du liquide BHI au début de l'expérience, nous avons recueilli 1,5 ml de solution dans la coupelle rotative après 1h30 d'utilisation. Le volume recueilli en quantité suffisant nous a permis de faire des triplicatas ainsi que des dilutions successives. Le volume d'air prélevé était de 900 litres. Une lecture quotidienne sera effectuée pendant 72 h après le début de l'incubation.

*Tableau n° 15: Tableau présentant le nombre de colonies de *Rhodococcus equi* comptabilisées sur boîte de gélose ANC après 72 heures de culture selon le numéro du triplicata et la dilution effectuée*

Nombre de colonies (UFC)		CIP 10 MR		
Numéro de triplicata		1	2	3
Dilutions	10^0	0	0	0
	10^{-1}	0	0	0

Nous n'avons pas mis en évidence *Rhodococcus equi* dans l'air de la stabulation où évoluait la jument (tableau n° 15). Le box n'ayant pas été contaminé, ces résultats sont cohérents. Cet essai a permis de valider la faisabilité de la technique et d'apporter les modifications nécessaires au protocole expérimental avant de pouvoir le tester en élevage. La position du CIP et le volume de BHI introduit dans la coupelle ont été modifiés. Enfin, cet essai a également été une révision de la maîtrise du protocole.

2.3.1.7 Validation du protocole dans deux haras

Dans le but de réaliser une étude complète afin de valider l'ensemble des techniques développées, nous avons réalisé une pré étude pour valider la technique de quantification de *Rhodococcus equi* dans l'air dans deux haras distincts. L'objectif de ce paragraphe est ici d'expliquer la mise en œuvre de cette méthode au sein des haras afin d'aboutir à un protocole parfaitement maîtrisé et sans écueil pour débuter notre étude. Nous reviendrons sur les objectifs de cette étude dans la deuxième partie consacrée exclusivement à l'étude.

2.3.1.7.1 Choix du haras

Nous expliquerons ici très brièvement nos motivations concernant la sélection des haras. En effet, nous reviendrons davantage sur ce point dans la partie dédiée à l'étude et à sa conception. Nous avons décidé de réaliser cette pré étude dans deux haras différents dans l'idée de poursuivre ensuite une étude. Les critères de sélection pour cette pré étude sont donc identiques. Tout d'abord ces deux structures doivent être de taille et de vocation semblables. Ensuite ces deux élevages doivent être situés à proximité du laboratoire de l'ANSES de Dozulé

pour limiter le temps perdu dû aux déplacements dans l'hypothèse où nous serions amenés à retourner au laboratoire pour les manipulations du CIP 10 MR sous le poste de sécurité microbiologique. En ce qui concerne la structure, celle-ci doit présenter trois types de milieux différents : un champ, une zone d'attente de type enclos ou barre d'échographie et un box paillé. En outre nous devons pouvoir faire évoluer une jument suitée munie des appareils de mesure dans ces trois milieux. Enfin, les responsables du haras doivent être suffisamment disponibles pour pouvoir nous accueillir pour les périodes de mesures. Cependant l'un d'entre eux, nommé H1, doit être parfaitement exempt de rhodococcose et ce depuis plusieurs années. L'autre nommé H2 doit connaître des problèmes de rhodococcose récurrents depuis plusieurs années. Ces cas de rhodococcose doivent avoir été étayés par des rapports d'examens cliniques et complémentaires et des autopsies.

2.3.1.7.2 Choix des surfaces

Avant de débuter cette pré étude, nous avons réalisé une visite des élevages pour s'assurer qu'ils répondaient bien aux critères définis. Cette visite a été l'occasion de présenter aux éleveurs le mode opératoire ainsi que de recueillir les informations nécessaires sur chaque haras. Ces informations seront présentées dans la partie consacrée à l'étude. Après cette visite, nous avons déterminé les zones de prélèvements dans chaque haras qui sont le paddock, le box paillé et le champ. Encore une fois les zones de prélèvements seront présentées dans le détail ultérieurement.

2.3.1.7.3 Choix du porteur du CIP

En accord avec les éleveurs, pour des raisons pratiques et de sécurité, il nous a semblé préférable de faire porter le CIP 10 MR par la jument et non par le poulain. En effet, le poids relatif de l'appareil par rapport à celui de la tête est quasiment négligeable chez la jument alors que le port du CIP 10 MR pourrait se révéler gênant chez le poulain. De plus, il est bien plus difficile d'attraper un poulain que sa mère. Pour cette raison, les manipulations de fixation, de mise en route et d'arrêt de l'appareil auraient été compliquées en installant les appareils sur les poulaillers. Pour autant la mesure obtenue de l'exposition à *Rhodococcus equi* n'en est pas moins une bonne approximation de celle du poulain. Ainsi, la rhodococcose atteint les poulaillers âgés de 3 semaines à 6 mois maximum. Ils ne sont donc pas sevrés et évoluent le plus souvent aux côtés de leur mère.

Au cours de cette pré étude, nous avons tenté de nouveau d'orienter la tête alvéolaire du CIP 10 MR vers le bas mais le même bruit est apparu que lors du premier essai à l'ANSES. Nous avons donc définitivement tourné la tête alvéolaire vers le haut.

Photographie n° 32: CIP portés par la jument dans le champ du haras H2. Le poulain reste le plus souvent à proximité de sa mère



Pour cette pré étude, nous avons fixé 12 fois le matériel puisque nous avons effectué des prélèvement à deux dates pour chaque haras et sur 3 surfaces différentes à chaque fois. Nous avons donc fixé le matériel sur plusieurs juments mais toujours des juments suitées, c'est à dire accompagnées de leur poulain de l'année. Il est important de souligner que toutes les juments ont facilement accepté la présence des CIP sur leur licol (photographie n° 32). De même, les poulains ont parfois manifesté leur intérêt pour les appareils après la pose puis s'y sont rapidement habitués. De même nous n'avons pas observé de comportements visant à se débarrasser de l'appareil ou bien à le détruire. Enfin, aucune jument n'a semblé être perturbée par la présence de cet appareil de mesure. Elles ont pu poursuivre leurs activités normalement et ont pu librement galoper, s'abreuver ou bien s'alimenter. Ces précisions sont déterminantes car toute modification de comportement pourrait venir fausser la mesure de l'exposition réelle.

2.3.1.7.4 Résultats, discussion et enseignements

En ce qui concerne le choix de la distance du haras, nous avions choisi des haras localisés dans un rayon de 25 kilomètres afin de pouvoir revenir au laboratoire en cas de prélèvements successifs qui nécessiteraient des manipulations du CIP 10 MR sous le poste de sécurité microbiologique. Finalement nous avons fait l'acquisition de nouvelles coupelles rotatives et de

têtes alvéolaires afin d'en avoir suffisamment de stériles pour les 3 prélèvements successifs. Nous avons décidé de d'ouvrir de la tête alvéolaire pour récupérer le BHI après prélèvement sans le poste de sécurité microbiologique. Nous nous installons donc dans un lieu à l'abri du vent et propre pour procéder à cette opération munis de gants. La coupelle rotative remplie du BHI est alors extraite pour être rapidement déposée dans un pilulier stérile correctement identifié. La mise en place d'une nouvelle coupelle rotative stérile, du milieu BHI à l'intérieur et la fermeture de la tête alvéolaire se sont effectuées dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas eu de contamination ou qu'elle n'a pas posé de problème lors de la lecture des boîtes. Nous pouvons donc désormais réaliser des prélèvements successifs sans avoir systématiquement recours au poste de sécurité microbiologique. Il s'agit là d'un point important car à terme il sera donc possible de partir pour des campagnes de prélèvements dans des élevages éloignés du laboratoire de Dozulé.

Les prélèvements ont eu lieu les 7 et 20 avril 2011 dans le haras H1 et les 8 et 21 avril 2011 dans le haras H2. L'ensemble des données brutes concernant le relevé des conditions climatiques, de terrain ainsi que les données liées à l'échantillonnage par le CIP 10 MR est présenté dans le tableau de résultat en annexes. Nous avons détecté la présence de *Rhodococcus equi* dans l'air alvéolaire une fois pour chaque haras sur les prélèvements réalisés pour ces dates. Pour le haras H1, nous avons comptabilisé une colonie de *Rhodococcus equi* dans la fraction alvéolaire de l'air du champ le 20 avril 2011. La concentration en *Rhodococcus equi* est de 2,22 UFC/ m³ air alvéolaire après avoir exploité les valeurs obtenues pour chaque triplicata selon la formule de la norme EN 13098 :2000. Pour le haras H2, nous avons également comptabilisé une colonie de *Rhodococcus equi* dans la fraction alvéolaire de l'air du paddock le 21 avril 2010. Après calcul, nous obtenons la valeur de 1,58 UFC/m³ d'air alvéolaire. Nous nous garderons bien de tirer des conclusions sur un nombre aussi faible de résultats. Cependant l'examen PCR a permis de montrer que ces deux souches isolées n'étaient pas virulentes. C'est-à-dire qu'elles ne possédaient pas le plasmide de virulence vap A. Nous pensons également que les prélèvements réalisés au mois d'avril peuvent être quelques peu prématurés pour observer une différence notable entre les deux haras

2.3.2 Quantification des poussières dans l'air

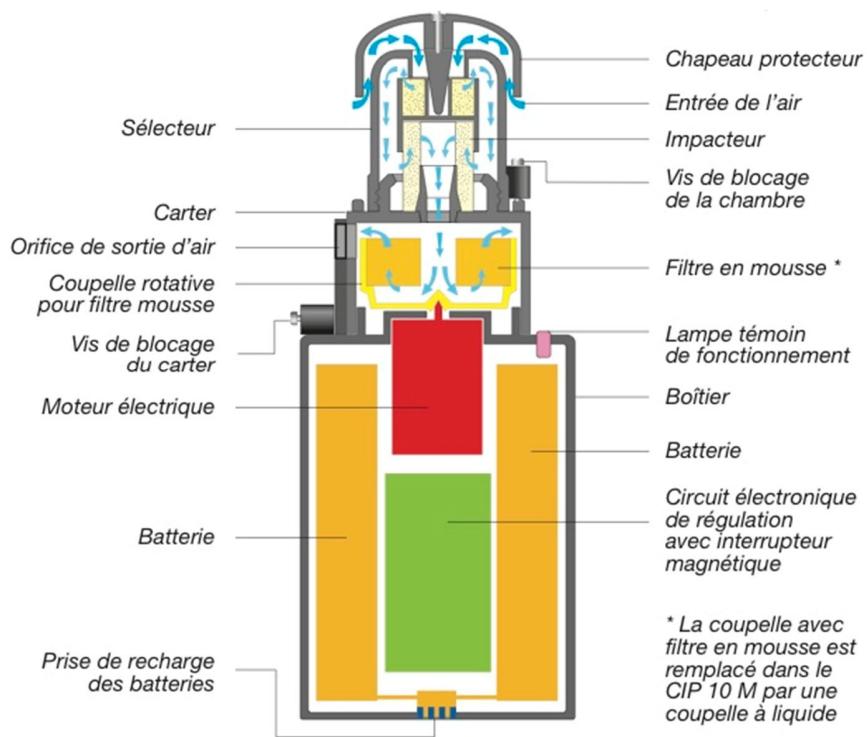
Par le passé plusieurs auteurs ont suggéré le rôle que pourraient avoir les poussières dans l'aérosolisation de *Rhodococcus equi* (Chaffin *et al.* 2003b; Tapprest *et al.*, 2012). Certains ont tenté d'établir des corrélations entre un paramètre climatique et la prévalence clinique de la maladie ou bien la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol. Aussi, nous avons le sentiment que si une relation entre la quantité de poussières en aérosols et la concentration dans l'air en *Rhodococcus equi*, une relation existerait entre la concentration dans l'air en *Rhodococcus equi* et une combinaison de facteurs climatiques et de terrain. Parmi les facteurs climatiques, nous pensons à la température, à l'hygrométrie de l'air, à la vitesse du vent. Au chapitre des paramètres de terrain, nous comptons entre autres, le type de sol, l'hygrométrie du sol ou encore l'enherbement des surfaces. Il nous paraît donc plus pertinent de pouvoir quantifier la concentration de poussières par unité de volume d'air. C'est cette concentration qui pourrait être liée à une combinaison de tous les facteurs précédemment cités. Nous avons donc développé une méthode pour pouvoir objectiver la quantité de poussières dans l'environnement du cheval.

2.3.2.1 Présentation de la technique

2.3.2.1.1 Mode de fonctionnement

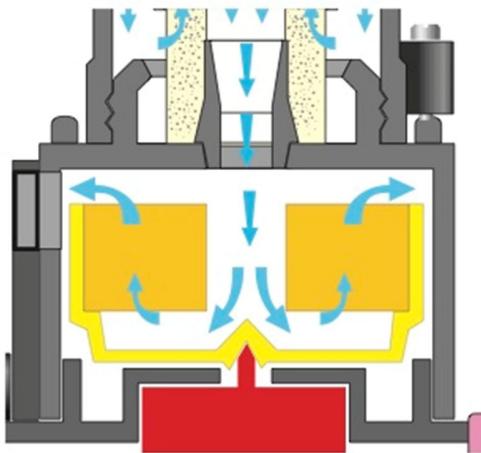
Le CIP dans sa version CIP 10 permet de mesurer une quantité de poussières dans l'air. Selon un principe similaire à celui décrit pour le CIP 10 M, le CIP 10 comporte une coupelle rotative équipée d'une mousse de polyuréthane, montée sur l'arbre d'un moteur tournant à grande vitesse à l'intérieur d'une enceinte comportant une entrée d'air axiale et d'une sortie d'air tangentiale. La rotation de la cassette ainsi formée génère le débit d'air par effet ventilateur et assure la captation de la fraction d'aérosol préalablement sélectionnée par le sélecteur placé en amont du système. Le moteur fonctionne sur batteries et sa vitesse est commandée par un circuit électronique de régulation. Le débit est relié linéairement à la vitesse de rotation. L'air est aspiré par une fente omnidirectionnelle d'échantillonnage, formée par le corps du sélecteur proprement dit et le chapeau protecteur (figure n° 6). A l'intérieur du sélecteur, il suit un circuit plus ou moins complexe en fonction de la sélection désirée des particules. La fraction non désirée est retenue. La fraction sélectionnée passe ensuite à travers une mousse de polyuréthane (figure n° 7). Les particules restant en suspension après sélection sont alors captées et l'air filtré est rejeté dans l'atmosphère par l'orifice tangentiel de l'enceinte renfermant la coupelle rotative.

*Figure n° 6: Schéma du CIP 10 en coupe longitudinale.
Présentation de la nomenclature et du trajet suivi par l'air et ses aérosols*



Le CIP 10 est équipé de sélecteurs qui échantillonnent les aérosols en accord avec les courbes conventionnelles décrites dans la norme européenne NF EN 481 à l'exception du cas des très fines particules. En effet, le principe de collecte du CIP 10 génère un rejet des très fines particules. Selon le constructeur, ces pertes peuvent se chiffrer à 30 %. Toutefois, ces pertes sont également observées chez un être vivant de la même manière.

Figure n° 7: Agrandissement de la zone où se loge la coupelle de plastique. Détail du trajet de l'air et des aérosols.

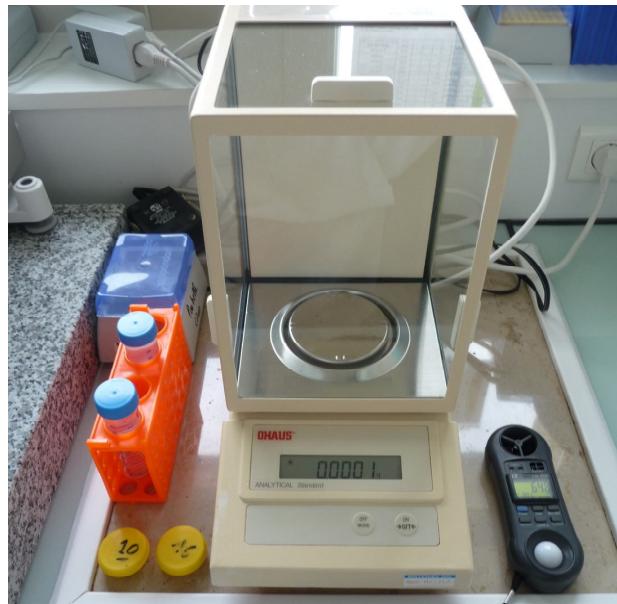


Pour évaluer la quantité de poussières nous avons étudié la concentration pondérale des aérosols sur mousse rotative. Le principe est donc d'évaluer la quantité de poussière en aérosols en mesurant la différence de masse entre la mousse avant et après le prélèvement.

2.3.2.1.2 Protocole de pesée et préparation des mousses

Pour réaliser cette pesée nous avons utilisé une balance de précision avec une sensibilité au 10^{ème} de milligramme (photographie n° 33). Cette balance est le modèle *Analytical Standard* de la marque Ohaus®. Elle a été contrôlée et certifiée conforme en novembre 2010 par la société Normandie pesage Pour ces premiers essais, nous avons construit un protocole simple pour évaluer rapidement l'intérêt d'une telle mesure. Il comporte de nombreuses imprécisions qui seront corrigées par la suite si cette technique s'avère être efficace. Les mousses utilisées sont à usage unique en polyuréthane.

Photographie n° 33: La balance de précision utilisée, fermée par des vitres



Matériel :

- Mousses en polyuréthane à usage unique,
- Gants en nitrile (non talqués),
- Balance de précision au 10^{ème} de milligramme,
- Coupelles et leurs couvercles correctement identifiés.

Protocole :

Pesée avant prélèvement

- Une fois la balance de précision tarée, peser alors les mousses de prélèvement,
- Répéter la pesée une deuxième fois pour obtenir une valeur moyenne,
- Remettre les mousses dans leurs coupelles respectives.

Pesée après prélèvement

- Une fois la balance de précision tarée, peser alors les mousses de prélèvement,
- Répéter la pesée une deuxième fois pour obtenir une valeur moyenne,
- Remettre les mousses dans leurs coupelles respectives,
- Déduire la masse d'aérosols prélevés en calculant la différence.

2.3.2.2 Quantification des fractions alvéolaires et totales pour différents temps de collecte

Photographie n° 34: le CIP 10 dans sa version capable de collecter les poussières totales de l'air. Seuls le carter et une buse sont fixés au dessus de la coupelle de prélèvement

Nous comparons ici la quantité de poussières récoltées selon la fraction « poussières alvéolaires » ou « poussières totales » et ce pour deux temps de collecte différents 10 et 30 min. Les poussières alvéolaires ont une taille inférieure à 7 µm. Nous avons utilisé le CIP dans deux configuration : CIP 10 (photographie n° 34) et CIP 10 M.

L'expérience a lieu dans un box paillé fermé dans lequel une personne marche autour des CIP 10 et CIP 10 R posés au sol. Un mode de pesée rapide, mais comportant certaines imprécisions, permet d'obtenir une approximation des performances attendue. Cette expérience a eu lieu le 6 octobre 2010. La température était de +20,7 °C et l'hygrométrie de 63 %.



Protocole :

- Peser la mousse selon le protocole décrit ci-dessus,
- Déposer la mousse dans la coupelle,
- Fixer alors la coupelle et sa mousse sans le couvercle sur l'axe rotatif du CIP 10 ou bien CIP 10 M sous le poste de sécurité microbiologique,
- Après l'essai, ouvrir le CIP sous le poste de sécurité microbiologique puis couvrir la coupelle avec son couvercle respectif,
- Peser alors la mousse selon le protocole décrit ci-dessus.

Tableau n° 16: Masse (g) des mousses rotatives avant ou après le prélèvement en fonction de la fraction de l'air sélectionnée et du temps de collecte (min). ΔM est la différence de masse entre la masse finale après prélèvement et la masse initiale

Temps de collecte (min)	Masse (g)	CIP 10 R	CIP 10
10	Avant prélèvement	0,1942	0,1879
	Après prélèvement	0,1945	0,1882
	ΔM_{10}	0,0003	0,0003
30	Avant prélèvement	0,1970	0,1867
	Après prélèvement	0,1974	0,1871
	ΔM_{30}	0,0004	0,0004

Nous mesurons systématiquement une masse supérieure après chaque prélèvement ce qui vient conforter la bonne sensibilité de notre balance de précision (tableau n° 16). De plus, il ressort que, plus la durée de prélèvement est longue, plus la masse de particules collectées est importante. En effet, on obtient $\Delta M_{10}=0,0003$ g pour un prélèvement de 10 minutes et $\Delta M_{30}=0,0004$ g pour un prélèvement de 30 minutes. En revanche, la différence de masse n'est pas tout à fait cohérente puisque nous pourrions nous attendre à une valeur plus importante pour ΔM_{30} . Enfin nous remarquons que la quantité de poussières alvéolaire recueillie est égale à la quantité de poussières totales ce qui semble incohérent sauf à penser qu'il n'y ait que des poussières alvéolaires dans l'air.

Les valeurs obtenues, de l'ordre de 3 mg/m³, (0,3 mg pour 10 minutes de collecte) sont conformes à la littérature. En effet, dans les études de la qualité de l'air réalisées en aviculture, c'est-à-dire dans un autre milieu confiné poussiéreux, les valeurs de poussières respirables s'échelonnent entre 0,001 et 6,5 mg/m³ (Huneau-Salaun *et al.*, 2010).

Il faut donc poursuivre ces essais avec ce même matériel en prolongeant la durée des prélèvements et perfectionnant le protocole de pesée pour s'affranchir de tous les éventuels biais.

2.3.2.3 *Perfectionnement du protocole*

Nous avons ensuite amélioré notre protocole en suivant la norme NF X 43-262 ainsi les recommandations de la fiche 085 Métropol concernant la détermination de la concentration pondérale d'un aérosol sur mousse tournante (CIP 10), éditée par l'Institut Nationale de la Recherche et de la Sécurité.

En préambule, celle-ci reprécise les principes de fonctionnement de la méthode. Ainsi la détermination de la masse d'aérosol prélevée se fait par différence entre la masse de la coupelle vierge (mousse en polyuréthane incluse) et sa masse après prélèvement. Elle précise également que les variations de masses induites par des modifications des conditions hygrométriques seront compensées par les variations subies par les témoins. Il n'y a pas de nombre de témoins précisé mais le chiffre de 3 coupelles témoins pour 10 coupelles de prélèvements est avancé.

Matériel:

- CIP 10 (= Collecteur/Capteur Individuel de Poussières),
- Gants en nitrile,
- Mousses en polyuréthane et leurs Coupelles numérotées avec leurs couvercles respectifs numérotés, Pince brucelles,
- 1 Buse, 1 carter,
- Papier aluminium, Tournevis,
- Autoclave, Etuve à + 50 °C, Un PSM de classe II, Balance analytique (pesée à 0,0001 g près,
- Eau déionisée et savon liquide.

Protocole:

Opérations préalables

- Laver les mousses à l'eau savonneuse tiède et les presser plusieurs fois pendant le lavage et les premiers rinçages. Rincer au moins 5 fois à l'eau déionisée filtrée,
- Laver séparément les coupelles avec leur couvercle,
- Faire sécher les mousses et les coupelles à l'étuve en les plaçant sur un plateau propre pendant 12 h à environ +50 °C,
- Placer les mousses propres dans une coupelle au moyen d'une pince,

- Ouvrir les coupelles et placer le couvercle sous la coupelle ouverte. Les mettre pendant 4 heures dans l'étuve à +50 °C,
- Conditionner ensuite les coupelles par un séjour d'une nuit dans le local de pesée.

Pesée des coupelles (avec mousses)

- Avant la pesée des coupelles, s'assurer que la balance est à zéro,
- Peser chaque coupelle repérée et enregistrer la valeur affichée après amortissement des oscillations,
- Toujours intercaler la pesée des coupelles servant de témoins dans la série de pesée des autres coupelles.

Ouverture des échantillonneurs

- Ouvrir les coupelles et placer le couvercle sous la coupelle ouverte,
- Placer les coupelles ouvertes pendant 4 h à l'étuve à +50 °C,
- Conditionner les coupelles ouvertes par un séjour d'une nuit dans le local de pesée.

Pesée

- Procéder comme pour les pesées initiales en intercalant les pesées des coupelles témoins et celles des coupelles utilisées.

Parmi les évolutions remarquables qu'apporte ce protocole par rapport à la démarche sommaire que nous avions eu pour la précédente pesée, nous noterons qu'il faut désormais peser la coupelle, la mousse et le couvercle simultanément et non pas seulement la mousse. En effet, des aérosols sont amenés à être déposés dans le fond de la coupelle de plastique et non pas uniquement sur la mousse. La figure n° 7 permet de comprendre ce phénomène en suivant le trajet de l'air. En outre nous définissons des témoins qui ont pour rôle de compenser l'instabilité hygrométrique des mousses en prenant en compte les variations de masse subies par les témoins dans la salle de pesée ou bien sur le terrain.

Un calcul permet ensuite de déterminer la concentration massique des aérosols dans l'air à partir de la différence de masse mesurée. Soient x , le numéro du prélèvement et Q_x la masse d'aérosol (en mg) prélevé sur la mousse en polyuréthane. Soit T_x , les masses des témoins. Soit ΔT_x ou ΔM_x , les variations de masse mesurées.

$$Q_x = \Delta M_x - 1/3 (\Delta T_1 + \Delta T_2 + \Delta T_3)$$

La concentration pondérale de l'aérosol dans l'atmosphère prélevée C_x (en g/m³) est exprimée ainsi :

$$C_x = Q_x / V$$

Où V est le volume d'air prélevé exprimé en m³.

2.3.2.4 Premier essai à l'ANSES

2.3.2.4.1 Matériel retenu

Un premier essai a été réalisé à l'ANSES le 23 février 2011. Cet essai a directement été réalisé sur un cheval. Nous avons pu utiliser un deuxième Rhodopopus pour fixer le CIP 10 R sur le licol du cheval. En réalité, cette expérience a été réalisée concomitamment avec le premier essai du CIP 10 MR. La jument a donc porté un CIP 10 MR et un CIP 10 R sur son licol. L'essai s'est déroulé dans une stabulation paillée de 30 mètres carrés de surface.

Matériel :

- 7 coupelles et leurs couvercles identifiés,
- 7 mousses neuves en polyuréthane,
- Balance analytique de précision,
- 1 Buse, 1 carter,
- Papier aluminium, Tournevis,
- Autoclave, Etuve à + 50 °C, Un PSM de classe II,
- Eau déionisée et savon liquide,
- CIP 10 R,
- Gants en nitrile,
- Rhodopopus et ses deux lanières de cuir,
- Piluliers,
- Pince brucelles.

2.3.2.4.2 Protocole retenu

Préparation des mousses

Conformément au nouveau protocole de préparation des mousses, ces dernières ont été lavées puis placées à l'étuve 12 heures 18 puis 4 heures le 22 avant d'être stockées dans la salle de pesée pour la nuit entière (photographies n° 35 et n° 36). Les coupelles et leurs mousses sont placées dans des piluliers numérotés pour éviter une modification de leur masse, ce qui perturberait la mesure.

Les mousses sont identifiées comme suit :

- 1 : prélèvement 1 (box),
- 4 : témoin (appareillé au prélèvement 1, témoin terrain),
- 6 : témoin (appareillé au prélèvement 1, témoin salle de pesée),
- 7 : Joker, utilisable si contamination ou incident.

Photographie n° 35: : L'étuve destinée exclusivement à la préparation des mousses



Photographie n° 36: La manipulation des mousses ne s'effectue qu'avec des gants en nitrile et une pince



Pesée des mousses avant prélèvement

Elle a eu lieu le 23 février à 10h30. La température ambiante dans la salle de pesée était de +16,3 °C et l'hygrométrie dans la salle de 53,9 %. Cette pesée a eu lieu conformément aux recommandations décrites précédemment. Les résultats sont consignés dans le tableau n° 17.

Tableau n° 17: Masses des coupelles mesurées avant prélèvement

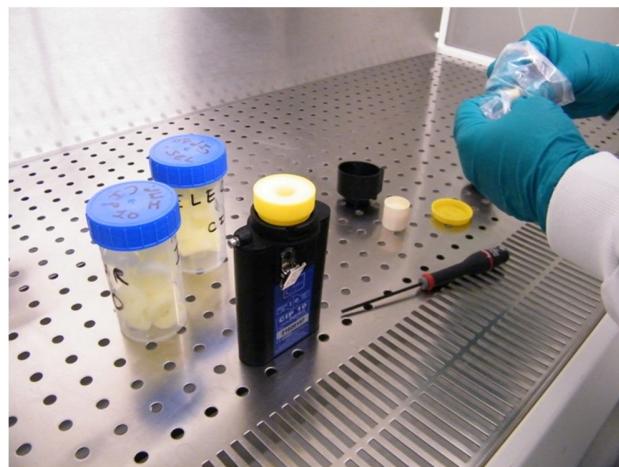
N° coupelle	4	1	6	7
Masses (g)	5,7556	5,7596	5,7573	5,7607

Préparation du CIP 10

- Au préalable, stériliser la carter et la tête alvéolaire à l'autoclave,
- Sous le poste de sécurité microbiologique, ouvrir le couvercle avec des gants en nitrile,

- Fixer le la coupelle de plastique jaune et sa mousse sur l'axe rotatif du CIP 10,
- Disposer alors le carter et sa buse par-dessus,
- Procéder à l'installation de la tête alvéolaire en utilisant des mousses sélecteur et impacteur neuves (photographie n° 37),
- Fermer le CIP 10 en serrant les vis.

Photographie n° 37: Installation de la coupelle et de la mousse sous le poste de sécurité microbiologique



Phase de prélèvement

- Démarrer le CIP 10 R à l'aide de l'aimant,
- Positionner le CIP 10 R dans le Rhodopopus puis fixer l'ensemble avec les deux lanières de cuir,
- Une fois le temps de prélèvement écoulé, décrocher le CIP 10 R du licol,
- Arrêter son fonctionnement grâce à l'aimant,
- De retour sous le poste de sécurité microbiologique et munis de gants, ouvrir le carter puis fermer la coupelle avec son couvercle,
- Déposer ensuite la coupelle fermée dans son pilulier.

Pesée des mousses après prélèvement

Une fois le prélèvement terminé, les coupelles sont placées à l'étuve pendant 4 heures le 23 février, couvercle ouvert. Ensuite, elles sont conditionnées pour la nuit dans la salle de pesée. Les pesées ont lieu le lendemain matin, le 24 février à 8h30 (tableau n° 18). La température ambiante la pièce était de +17,4 °C et l'hygrométrie de 56 %.

Tableau n° 18: Masses des coupelles mesurées avant prélèvement

N° coupelle	4	1	6	7
Masse (g)	5,7562	5,7613	5,7581	Joker inutilisé

2.3.2.4.3 Résultats obtenus

Au cours de cette expérience, il n'y pas eu d'incident. L'ensemble du protocole de traitement des mousses et de mise en œuvre du prélèvement est maîtrisé. Nous avons calculé la concentration massique des aérosols alvéolaires auxquels s'est exposée Opaline dans la stabulation paillée :

$$C_1 = Q_1/V = (\Delta M_1 - 1/2 (\Delta T_4 + \Delta T_6))/V$$

Nous avons obtenu la valeur de 1 mg d'aérosols alvéolaires/ m³ d'air.

2.3.2.5 Validation du protocole dans deux haras

Afin de valider notre technique, nous avons souhaité la tester dans deux élevages différents et sur des surfaces déterminées.

2.3.2.5.1 Choix du haras

En réalité, cette validation de la technique a été menée de front avec l'étude de la corrélation entre la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et la concentration massique en aérosols. Ainsi l'un des objectifs de notre étude sera de mettre en œuvre conjointement les deux techniques que nous avons développées. Les résultats obtenus permettront d'objectiver l'existence d'une relation ou bien de l'infirmer. Aussi les critères de choix des élevages ont, entre autres, porté sur le statut des haras vis-à-vis de la rhodococcose. Pour valider notre méthode de quantification de *Rhodococcus equi* dans l'air en parallèle, il nous a semblé important de sélectionner un haras sain, H1, et un haras atteint, H2. La pré étude visant à valider le protocole de quantification des aérosols comprenait deux visites pour chaque haras à quinze jours d'intervalle. Chaque visite a permis de réaliser trois prélèvements dans des surfaces variées.

2.3.2.5.2 Choix des surfaces

Dans notre protocole, nous avons imaginé déterminer la concentration massique en aérosols dans des lieux bien caractérisés qui sont le lot quotidien d'un poulain dans un élevage. Ainsi nous avons sélectionné trois surfaces qui peuvent être normalement fréquenté par un poulain âgé de 6 semaines à 6 mois. Nous avons donc retenu le box normalement paillé d'environ 3,5 mètres de côté. En élevage, la jument suitée reste avec son poulain la nuit durant au début du printemps puis parfois en journée à l'arrivée des jours plus cléments. Nous avons également sélectionné le paddock, qui est une zone extérieure aux dimensions réduites (environ 20 m x 35 m). La jument suitée y est lâchée le plus souvent seule avec son poulain en début de journée. Il s'agit souvent d'une zone sollicitée où l'herbe est peu abondante. Enfin, nous avons choisi une troisième surface, le champ. Il s'agit d'un herbage de grandes dimensions (environ 100 m sur 250 m). Le poulain y est lâché avec sa mère pour la journée et parfois la nuit dans certains haras. Avant le début de la pré étude, une visite a permis de s'assurer que les haras répondaient bien aux critères définis. Nous avons effectué un repérage des surfaces sur lesquelles seront faits les prélèvements.

2.3.2.5.3 Choix du porteur du CIP

Pour toutes les raisons présentées dans le paragraphe concernant le choix du porteur du CIP 10 MR pour la quantification de *Rhodococcus equi* dans l'air, nous avons également choisi de fixer le CIP 10 R sur la jument.

En outre, dans l'optique d'étudier une corrélation supposée entre la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air et la concentration massique en aérosols, il était déterminant de placer le CIP 10 R dans les mêmes conditions que le CIP 10 MR. Ainsi en fixant un appareil de chaque côté du licol, ces derniers sont déplacés par la jument au même endroit (photographie n° 37). Étant donné que le poulain se trouve le plus souvent aux côtés de sa mère, nous avons ici une mesure de la concentration massique en aérosols dans l'environnement du poulain. Dans un premier temps, le CIP 10 R a été fixé avec sa tête alvéolaire vers le bas. Dès la deuxième visite, cette tête a été orientée vers le haut pour véritablement placer le CIP 10 R dans des conditions identiques à celles du CIP 10 MR.

Photographie n° 10: Le CIP 10 R est situé à gauche, le CIP 10 MR est fixé à droite de la jument



2.3.2.5.4 Résultats obtenus

Pour cette première étude, nous avons utilisé 4 coupelles témoins. Il y avait 2 témoins conservés dans la salle de pesée ainsi que 2 témoins de terrain, c'est-à-dire 2 coupelles qui suivaient le même trajet que les coupelles utilisées dans les CIP 10 R. Ces deux témoins terrain ont subi les déplacements dans les élevages en voiture, mais sont restés dans leurs piluliers. Les séances de prélèvements ont eu lieu les 7 et le 20 avril 2011 dans le haras sain H1 et les 8 et 21 avril 2011 dans le haras contaminé, H2. L'intégralité des données, c'est-à-dire les relevés des conditions météorologiques, les pesées dans chaque coupelle et les conditions climatiques de la salle de pesée est présentée dans le tableau en annexe n° 7, n° 8, n° 11 et n° 12. Nous présentons ci-après les résultats avec les concentrations massiques en aérosols calculées selon la formule présentée précédemment.

Tableau n° 19: Concentrations massiques en aérosols en fonction de chaque haras, des surfaces et des dates de prélèvement

Massee (g)	H1			H2		
	Paddock	Box	Champ	Paddock	Box	Champ
Visite n°1	- 0,000555	- 0,000222	-0,0000952	- 8,33 E-05	- 0,00186	- 0,00230
Visite n°2	- 0,000222	-2,46 E-16	0,000777	0,00688	- 0,00122	- 0,0109

2.3.2.5.5 Problèmes rencontrés

Ces résultats mettent en évidence que 9 valeurs sur 12 sont négatives (tableau n° 19). Les 2 autres sont positives mais extrêmement faibles. Il est totalement incohérent d'obtenir des résultats négatifs. En effet cela signifie globalement que la masse de la mousse a diminué et ce malgré le contact avec les aérosols lors du prélèvement. Une pesée négative peut provenir de deux phénomènes. Soit la masse mesurée de la coupelle avant prélèvement est plus faible que celle mesurée après prélèvement. Soit cette différence de masses pesées reste positive, mais les masses des témoins mesurées à la fin de l'expérience sont plus faibles que celles mesurées au début. Dans ce dernier cas ce sont les témoins qui ont pour rôle de prendre en compte les variations hygrométriques subissent des variations de masse plus importantes que la mousse exposée au contact avec les aérosols lors des prélèvements. Bien entendu, ces deux phénomènes peuvent se cumuler.

Lors de cette pré étude nous avions également mis en place un barème afin de réaliser une évaluation subjective des poussières présentes dans l'air. Les résultats de ce barème devaient être confrontés à la valeur objective à titre indicatif. En fonction de la quantité de poussière visible à l'œil nu, nous attribuions une lettre comme suit :

- A : Il n'y a pas de poussière visible à l'œil nu au-dessus de la surface étudiée
- B : Lorsque la surface étudiée est sollicitée par le cheval (mouvement et alimentation), de la poussière se dégage du sol
- C : De la poussière se dégage du sol, sans que la surface soit sollicitée

L'annotation « - » derrière la lettre signifie que les conditions sont améliorées (B^- proche de A). L'annotation « + » derrière la lettre signifie que les conditions sont détériorées (B^+ proche de C). Ainsi lors de ces premiers essais, nous avions attribué la lettre « B » pour le champ du haras H2 lors de la deuxième séance. Cette lettre « B » traduit la présence de poussières visibles à l'œil nu, or nous avons obtenu une valeur négative avec la technique quantitative. Cette incohérence supplémentaire nous invite à réviser notre méthode.

2.3.2.5.6 Choix de quantification des poussières totales

Ces premiers résultats nous ont conduit à une différence de masse rarement positive et bien souvent faiblement négative et ce malgré la qualité de notre protocole. Nous nous sommes alors adressés au laboratoire de Ploufragan mais aussi au constructeur de CIP.

Nos collègues de Ploufragan, ayant été confrontés eux-mêmes à ce problème par le passé, nous ont enseigné de nombreux points intéressants. Ainsi, ils nous ont préconisé:

- de réaliser la pesée des coupelles avec les coupelles à l'envers, c'est-à-dire avec le couvercle de la coupelle contre la balance et non la base de celle-ci, pour une plus grande stabilité de la pesée,
- de peser les mousses avant et après leur premier passage à l'étuve puis écarter celle subissant un écart de masse supérieur à 0,0003 g. En effet il existe une variabilité de sensibilité à l'humidité entre chaque mousse. Celles qui possèdent une trop grande sensibilité intrinsèque sont écartées de l'expérience,
- d'augmenter le nombre de témoins pour porter à 3 le nombre de témoins dans la salle de pesée et à 3 le nombre de témoins de terrain,
- d'investir dans un local de pesée dédié uniquement à cette opération et dont la température reste stable en permanence.

Quant à Monsieur Champion, responsable département environnement et responsable marché échantillonnage et prélèvement de la société ARELCO, son avis nous a permis de comprendre le rôle important de la stabilisation hygroscopique. La stabilisation hygroscopique est la nécessité de laisser les mousses dans une pièce une période de temps suffisamment importante pour que l'hygrométrie de cette mousse devienne stable. Il nous a aussi fait savoir que les particules alvéolaires pouvaient être elles-mêmes aéroportées par des particules de tailles supérieures ce qui signifie que nous ne serions pas en mesure de détecter *Rhodococcus equi* en conservant le filtre alvéolaire dans l'hypothèse où la bactérie serait aérosolisée par des particules alvéolaires. En effet, aérosolisée par de telles particules, elle viendrait se loger dans la tête alvéolaire, retenue par les mousses impacteur ou sélecteur sans pouvoir atteindre le milieu BHI de la coupelle métallique.

Il nous a donc paru judicieux d'évaluer la quantité de poussière totale et non seulement celle de la fraction alvéolaire. Pour vérifier la différence de masse effectivement observée entre les aérosols recueillis dans la fraction alvéolaire, nous avons réalisé une expérience avec notre nouveau protocole. Conformément aux recommandations de nos collègues de Ploufragan, nous avons augmenté le nombre de coupelles témoin. Cette expérience visait à fixer les deux CIP sur la tête d'un cheval dont l'un permettrait de quantifier les poussières totales (CIP 10) et l'autre la fraction alvéolaire, (CIP 10 R). Cette expérience complémentaire a eu lieu le 27 avril 2011 et a duré 1h30 avec le cheval évoluant librement dans un champ. La température était de 14,7 °C et l'hygrométrie de 54,5 %. Il y avait une pluie extrêmement fine qui n'était pas favorable à la présence d'aérosols dans l'air.

Les mousses étaient identifiées comme suit :

- Coupelle n°1 : Prélèvement aérosols fraction alvéolaire,
- Coupelle n°2 : Prélèvement aérosols air total,
- Coupelle n°3 : Témoin A salle de pesée,
- Coupelle n°4 : Témoin B salle de pesée,
- Coupelle n°5 : Témoin C salle de pesée,
- Coupelle n°6 : Témoin A terrain,
- Coupelle n°7 : Témoin A terrain,
- Coupelle n°8 : Témoin A terrain.

Tableau n° 20: Masses des différentes coupelles avant et après prélèvement. ΔM est la différence calculée entre la masse de la coupelle après prélèvement et stabilisation hygroscopique et la masse de la coupelle initiale

		Masse coupelle avant prélèvement(g)	Masse coupelle après prélèvement (g) sans stabilisation hygroscopique	Masse coupelle après prélèvement (g) après stabilisation hygroscopique	ΔM (g)
Numéro de coupelle	1	5,7533	5,7555	5,7545	0,0012
	2	5,7626	5,7674	5,7660	0,034
	3	5,7604	5,7608	5,7618	0,0014
	4	5,7601	5,7604	5,7611	0,0010
	5	5,7782	5,7784	5,7793	0,0011
	6	5,7618	5,7625	5,7628	0,0010
	7	5,7534	5,7538	5,7545	0,0011
	8	5,7622	5,7627	5,7632	0,0010

Dans cet essai la différence de masse subie par les témoins est similaire pour tous les numéros de témoin (tableau n° 20). Elle est en moyenne de 0,0011 g.

Cette expérience montre que la masse recueillie pour les poussières alvéolaires n'est pas quantifiable puisque la valeur obtenue (0,0012 g) est proche de la différence de masse subie par les témoins. En revanche, la concentration pondérale massique des poussières totales est tout à fait appréciable à l'aide de la formule suivante :

$$C_2 = Q_2/V = (\Delta M_2 - 1/6(\Delta T_3 + \Delta T_4 + \Delta T_5 + \Delta T_6 + \Delta T_7 + \Delta T_8))/V$$

Nous avons obtenu qu'y avait donc 0,0025 g de poussières totales / m³ d'air. De plus, une pesée réalisée immédiatement après le prélèvement, c'est-à-dire avant la stabilisation hygroscopique permet d'évaluer l'intérêt de cette opération. Ainsi nous constatons que les masses des mousses utilisées pour le prélèvement ont nettement augmenté après le prélèvement mais diminuent nettement après la stabilisation hygroscopique. Le prélèvement a donc probablement provoqué une augmentation de l'hygrométrie de la mousse et donc sa masse. Le conditionnement des mousses dans le local de pesée durant une nuit permet une stabilisation hygrométrique des coupelles de prélèvement et les coupelles témoins. Ainsi ces dernières vont toutes atteindre le même degré d'humidité.

L'impossibilité de réaliser les pesées dans une pièce exclusivement dédiée aux opérations de pesées et parfaitement conditionnée est un élément supplémentaire dans notre décision d'amender le protocole pour quantifier les poussières totales dans notre étude. En effet, il s'agirait d'un investissement très important. Les conditions de température et d'hygrométrie dans le local de pesée, dit « salle M5 » ne sont pas contrôlées, cependant elles sont mesurées en

permanence. Ainsi le logiciel Thermoclient® commercialisé par OCEASOFT permet un relevé continu de ces paramètres grâce à une sonde disposée dans la pièce M5. Enfin, la balance de précision est située dans un laboratoire de confinement de niveau 2 dont l'accès est badgé. De plus, les déplacements dans ce laboratoire sont soumis à une procédure décrivant les circuits à respecter pour circuler dans les locaux de l'unité MBPE.

Enfin notre expérience a mis en évidence la difficulté à quantifier les particules de l'air alvéolaire par rapport aux poussières totales. Elle a donc constitué un argument supplémentaire dans notre choix de quantifier les poussières totales et non alvéolaires.

Cette modification du protocole au cours de la pré étude s'est également accompagnée d'une réflexion en ce qui concerne la quantification de *Rhodococcus equi* dans l'air. En effet, nous avions effectué toutes nos mesures en quantifiant la bactérie dans la fraction alvéolaire de l'air. Or il n'est pas possible d'exclure l'hypothèse selon laquelle *Rhodococcus equi* puisse gagner les voies respiratoires supérieures en étant aérosolisées par des particules de tailles supérieures aux aérosols alvéolaires pour éventuellement infecter l'individu dans les alvéoles pulmonaires après avoir été véhiculées par des particules de plus faible diamètre dans cette seconde partie du trajet. Il devient donc intéressant de déterminer la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air total. Cependant, il n'était pas question de ne pas poursuivre les mesures de concentration de la bactérie dans la fraction alvéolaire de l'air. Nous avons donc opté pour l'acquisition d'un troisième CIP pour pouvoir effectuer nos diverses mesures simultanément.

2.4 PRÉLÈVEMENTS DE TERRE

Parallèlement à nos méthodes développées pour mesurer la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air et la concentration massique en aérosols dans l'air, nous avons jugé qu'il serait intéressant de quantifier également la concentration de *Rhodococcus equi* dans la terre. En effet, nous serons alors à même d'étudier une éventuelle corrélation entre les concentrations mesurées dans l'air et dans la terre. De plus, dans le cas où une telle corrélation serait alors validée, notre hypothèse d'aérosolisation de *Rhodococcus equi* pourrait également être étayée.

2.4.1 Choix des profondeurs de prélèvement

Des études des concentrations en *Rhodococcus equi* dans le sol ont déjà été réalisées auparavant. Certaines ont mis en évidence que la présence de *Rhodococcus equi* dans le sol était modérément corrélée à une incidence de la rhodococcose (Takai *et al.*, 2001), d'autres non (Muscatello *et al.*, 2006a; Cohen *et al.*, 2008; Martens *et al.* 2000). Aussi ces échantillonnages de terre ont été effectués en surface le plus souvent et à 20 centimètres de profondeur (Takai *et al.*, 1986). Nous avons donc trouvé judicieux de reprendre ces profondeurs en y ajoutant deux autres.

La première, de 5 centimètres, intermédiaire entre un prélèvement de surface et la profondeur de 20 centimètres. La deuxième de 50 centimètres permettrait de connaître la concentration de *Rhodococcus equi* en profondeur dans le sol. Pour chaque point de prélèvement, nous échantillonnerons donc un volume de terre pour 4 profondeurs.

2.4.2 Choix de la tarière

Ces prélèvements peuvent s'effectuer à l'aide d'une tarière. Une tarière manuelle est un tube métallique permettant de faire un forage pour extraire une carotte de terre à une profondeur déterminée. Ces tarières sont caractérisées par leur type, leur diamètre de carottage et leur longueur. Nous avons privilégié le modèle de la tarière Edelman qui est un modèle adapté au prélèvement d'échantillons peu remaniés dans des types de sols aussi variés que sable, argile ou limon. Elle sera donc adaptée au prélèvement de terre dans un champ. Le diamètre de carottage n'a pas besoin d'être important ; un diamètre de 4 centimètres sera suffisant. Elle mesure 120 centimètres de longueur ce qui permettra de réaliser aisément le prélèvement de terre à 50 centimètres. Le modèle retenu est une tarière monobloc dont le tourne à gauche est en acier forgé traité contre la corrosion. C'est ce tourne à gauche qui lui permettra de s'enfoncer dans le sol.

2.4.3 Protocole

Afin d'isoler et de dénombrer *Rhodococcus equi* dans des prélèvements de terre, nous avons repris un protocole mis au point par l'ANSES et validé en 2005.

Matériel :

- Gants à usage unique,
- Tarière Edelmann 120 cm,
- Piluliers,
- Balance,
- Eau distillée,
- Tube de plastique 50 ml à fond conique,
- Étuve,
- Agitateur mécanique,
- Géloses Columbia ANC +5 % de sang de mouton,
- Pipette Pasteur,
- Pipette râteau,
- Micropipette de 100 µl, cônes,
- Argospray®,
- Sur chaussures à usage unique.

Protocole :

Phase de prélèvement :

- Au préalable, des marques ont été dessinées sur la tarière pour obtenir des repères à 5, 20 et 50 cm de profondeur,
- La tarière est propre et doit avoir été désinfectée la veille avec de l'Argospray®,
- S'équiper de sur chaussures à usage unique avant de pénétrer sur la surface de prélèvement afin de prévenir une contamination,
- Localiser le lieu exact de prélèvement sur la surface concernée,
- Avec des gants à usage unique, recueillir un échantillon de terre en surface puis le placer dans un pilulier correctement identifié,
- A l'aplomb de ce premier prélèvement, descendre la tarière quelque peu au-delà de 5 cm de profondeur grâce au repère tracé (photographie n° 39),
- Extraire la tarière de la terre,
- La deuxième personne, munie de gants à usage unique, recueille l'échantillon de terre localisé à 5 centimètres de profondeur sans s'appuyer sur les bords de la tarière. Elle exerce une pression sur la terre située au centre du prélèvement afin de la déposer dans le pilulier placé en dessous (photographie n° 40),
- Nettoyer la tarière de la terre restante qui s'est déposée ses bords,
- Replacer ensuite la tarière dans le trou formé pour y effectuer les prélèvements à 20 et 50 cm. Il faut bien sélectionner la terre située au centre pour éviter une contamination de la terre par les bords de la tarière,
- Reboucher le trou,
- Après cette série de prélèvements, rincer abondamment la tarière avec de l'eau et la sécher. Répéter alors ce protocole à un autre point de prélèvement de la surface. Nous n'utilisons pas d'Argospray® car ce produit pourrait avoir un effet rémanent responsable de la destruction des bactéries prélevées.

Photographie n° 39: La tarière Edelman utilisée pour les prélèvements de terre



Photographie n° 40: La portion de la terre, située au milieu du tourne à gauche, est poussée dans un pilulier avec des gants à usage unique



Phase de mise en culture :

- Mettre 1 g de terre et 40 ml d'eau distillée stérile dans un tube à fond conique à usage unique de 50 ml,
- Mettre le tube 30 minutes à +37 °C sous agitation,
- Ensemencer une gélose Columbia ANC +5 % de sang de mouton avec 100 µl de la préparation,
- Étaler avec une pipette râteau,
- Mettre la gélose à l'étuve pour 48 heures à +37 °C,
- Dénombrer les colonies de *Rhodococcus equi* sachant qu'une colonie isolée donne 4.10^2 *Rhodococcus equi* / g de terre,
- Isoler ces colonies sur gélose Columbia ANC,
- Mettre la gélose à l'étuve pour 24 heures à +37 °C,
- Vérifier que les colonies sont bien des colonies de *Rhodococcus equi*.

2.4.4 Résultats obtenus sur les parcelles

Afin de valider ce protocole de quantification de *Rhodococcus equi* dans la terre, nous avons effectué des prélèvements de terre dans les parcelles contaminées par *Rhodococcus equi* sur le site de l'ANSES à Dozulé. Cette expérience s'est tenue le 7 octobre 2010. Sur chaque parcelle, herbe ou terre, deux sites de prélèvements sont sélectionnés. Le premier est situé à l'aplomb d'un crottin présent sur la parcelle. Nous rappelons que ce crottin est la source initiale de contamination de la parcelle. Le deuxième est localisé à l'aplomb d'un site distant de 50 cm de ce crottin. Enfin, un témoin négatif est choisi dans la zone située entre les deux parcelles contaminées. Cet échantillon est prélevé à 5 cm de profondeur. Pour les prélèvements dans les parcelles, nous avons échantillonné de la terre à 5, 20 et 50 centimètres de profondeur. Nous n'avons pas prélevé de terre en surface.

Tableau n°21: Nombre de colonies de Rhodococcus equi comptées sur les boîtes de gélose en fonction de la profondeur de prélèvement, du type de parcelle et de la proximité avec le crottin initialement contaminé

Nombre de colonies (UFC)		Parcelle contaminée Terre		Parcelle contaminée Herbe	
Site de prélèvement		Sous crottin	À 50 cm crottin	Sous crottin	À 50 cm crottin
Profondeur prélèvement (cm)	5	1	0	8	0
	20	1	0	3	2
	50	4	1	2	3

Ces résultats montrent que *Rhodococcus equi* est présent dans la terre aux différentes profondeurs échantillonnées et ce plus de cinq semaines après la date de contamination. Ainsi nous retrouvons la bactérie en quantité importante à plus de 50 centimètres de profondeur alors que la contamination n'a été réalisée qu'avec un crottin contaminé déposé en surface. De plus, l'étude du nombre de colonie de *Rhodococcus equi* en fonction des profondeurs et de la distance par rapport au crottin permet d'avoir une première idée de la répartition en deux dimensions au-dessous du crottin. Au vu des résultats, nous pouvons avancer l'hypothèse d'une diffusion radiale de la bactérie à partir du point de contamination. En effet, dans les prélèvements effectués à 50 cm du crottin, nous n'avons pas retrouvé la bactérie en surface. Il y a eu d'importantes

précipitations entre la date de contamination et de prélèvement. Nous pouvons donc penser que la pluie a joué un rôle important dans la diffusion de la bactérie dans le sol en l'entraînant en profondeur sans doute avec une faible composante horizontale qui pourrait être due au ruissellement

2.5 RÉALISATION DE LA POLYMERASE CHAIN REACTION

La bactérie nécessite un plasmide de virulence pour infecter le cheval. Ce plasmide est appelé *vap A*. Afin de déterminer si les souches recueillies sont virulentes, nous avons réalisé une *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

2.5.1 Utilisation d'un protocole interne

Le protocole utilisé a été mis au point par Monsieur Fabien Duquesne du laboratoire de pathologie équien de Dozulé. Il est inspiré d'une méthode publiée (Takai *et al.*, 1995). Toutes les étapes de la PCR se réalisent dans le laboratoire de l'unité MBPE, elles suivent le circuit PCR selon les procédures décrites dans le guide des activités support de microbiologie MBPE, un document interne à l'ANSES de Dozulé. Pour cette PCR, nous pouvons préparer l'ADN directement à partir d'une solution bactérienne lysée par chauffage à + 100°C. Une extraction d'ADN chromosomique n'est donc pas nécessaire. L'ADN préparé peut être ensuite conservé à - 80°C en attendant son utilisation.

La préparation (prémix et amores) se réalise sous le PSM de la salle de biologie moléculaire (M1 sur le circuit) et toujours dans la glace.

Le prémix est constitué de tous les produits nécessaires à la PCR hormis l'ADN, c'est-à-dire, le tampon Tris-HCl, les dNTP (A, C, G, T), la TAQ polymérase, le MgCl₂, le (NH₄)₂SO₄, Tween® 20 et un colorant pour remplacer le tampon de charge que l'on ajoute pour la migration. Ici le prémix est déjà prêt afin de minimiser les erreurs de pipetage, les contaminations et le temps de manipulation. Il s'appelle « Master Mix ReddyMix Abgene 2x ». Les amores (Rho1 et Rho 2) et l'eau sont ajoutées à ce prémix sous le PSM. Puis les 2µl d'ADN, provenant des échantillons à tester, sont ensuite ajoutés dans chaque puits sur la paillasse (en dehors du PSM).

Matériel :

- Micropipettes de 1000 µl, 200 µl, et 20 µl et ses Cônes avec filtre,
- MasterMix ReddyMix Abgene 2x,
- Les Amorces : Rho 1 : 5' GACTCTTCACAAGACGGT 3'
et Rho 2 : 5' TAGGCGTTGTGCCAGCTA 3',
- Eau ultra pure stérile,
- Tubes Eppendorf et Petits tubes Eppendorf spécifique à la PCR,
- PSM de classe II, Vortex, Glace, plaque chauffante.

Méthode :

- Préparer les échantillons d'ADN à partir des solutions bactériennes conservées dans des tubes Eppendorf . Chauffer les tubes 10 minutes à + 100 °C (dénaturation des membranes, enzymes). Centrifuger 1 minute à 5000 tours/minute,
- Préparer le prémix dans un tube Eppendorf sous le PSM de classe II, pour tous les échantillons en respectant les volumes ci-dessous.

Pour un petit tube Eppendorf avec un volume total de 25 µl dont 2µl d'ADN,

Master Mix 2x: 12,5 µl,
Rho1 (10 µM): 1 µl,
Rho2 (10 µM): 1 µl,
Eau: 8,5 µl,
(ADN : 2 µl),

- Répartir le prémix dans les petits tubes Eppendorf (23 µl par tube),
- Ajouter les 2µl d'ADN sur la paillasse en dehors du PSM dans leurs tubes respectifs.

L'amplification de l'ADN se réalise dans une pièce spécifique : la pièce M6. C'est une pièce exclusivement réservée aux manipulations utilisant le BET afin de limiter l'exposition du personnel à ce produit.

Une fois les Mix PCR prêts dans des petits tubes Eppendorf spécifiques pour la PCR, les mettre dans le thermocycleur et suivre le cycle PCR suivant :

- Dénaturation initiale à + 94 °C pendant 5 minutes,
 - Dénaturation à + 94 °C pendant 3 secondes,
 - Hybridation à + 56 °C pendant 45 secondes,
 - Élongation à + 72 °C pendant 1 minute,
 - Conservation à + 4 °C.
- 35 cycles

Ensuite, la migration du gel permet de séparer les fragments d'ADN linéaires en fonction de leur taille. La position des molécules d'ADN est révélée par coloration au BET, qui se fixe à l'ADN et lui confère une fluorescence rosée sous lumière ultraviolet. La taille des fragments est ensuite évaluée par comparaison avec le marqueur de taille déposé dans le premier puits.

Matériel :

- Agarose, TBE 1X, BET (0,7 mg/ml),
- Eau ultra pure,
- Flacons, spatule, bêcher,
- Gants en nitrile,
- 2 Peignes de 32 puits, support du gel, scotch,
- Micropipette de 20 µl et ses cônes avec filtre,
- Balance, micro-ondes, cuve d'électrophorèse, générateur, fils électriques.

Préparation du gel agarose et mise en place dans la cuve à électrophorèse :

Un gel d'agarose classique est réalisé avec un pourcentage d'agarose compris entre 0,5 et 2 %. Plus le pourcentage est élevé, plus de petits fragments d'ADN sont séparés et 1 % d'agarose sépare 600 paires de bases (pb). Pour notre fragment de 563 paires de bases environ, nous préparons un gel de 200 ml à 1% d'agarose pour une plaque avec 2 peignes de 32 puits soit 64 échantillons dont 3 servant de témoins (marqueur de taille, témoin négatif, témoin positif).

- Pesar les 2 g d'agarose puis ajuster à 200 ml avec la solution de TBE 1X,
- Faire chauffer au micro-ondes jusqu'à ébullition et homogénéisation du gel liquide,
- Laisser refroidir,
- Placer le support du gel sur une surface plane, fermer les bords à l'aide du scotch,
- Transférer le gel dans un flacon spécifique déjà contaminé par le BET (évite la contamination de tous les flacons),
- Ajouter 1 goutte de BET pour 50 ml d'agarose (pour 200 ml, on ajoute 4 gouttes),
- Couler le gel dans le support, enlever les bulles avec les peignes (choisis en fonction du nombre d'échantillons) puis les installer sur le support du gel,
- Attendre 20 – 30 minutes de polymérisation,
- Enlever délicatement le peigne,
- Mettre le support du gel dans la cuve à électrophorèse horizontale, immergé dans du TBE 1x.

Dépôt des échantillons :

- Déposer, dans le 1^{er} puits du gel, 10 µl du marqueur de taille de 100 kb puis, dans les puits suivants, les échantillons et témoins à l'aide d'une micropipette de 20 µl,
- Refermer le couvercle de la cuve puis faire les branchements fil rouge sur borne rouge du générateur et le fil noir sur la borne noir du générateur,
- Régler le générateur sur 85V / 1h et laisser migrer 1h.

La révélation de l'ADN se réalise à l'aide d'un appareil appelé « Gbox Syngene » MBPE UV 005 contenant une table UV et un appareil photo caméra relié à l'ordinateur. Le logiciel « GeneSnap from SynGene » analyse ensuite l'image du gel.

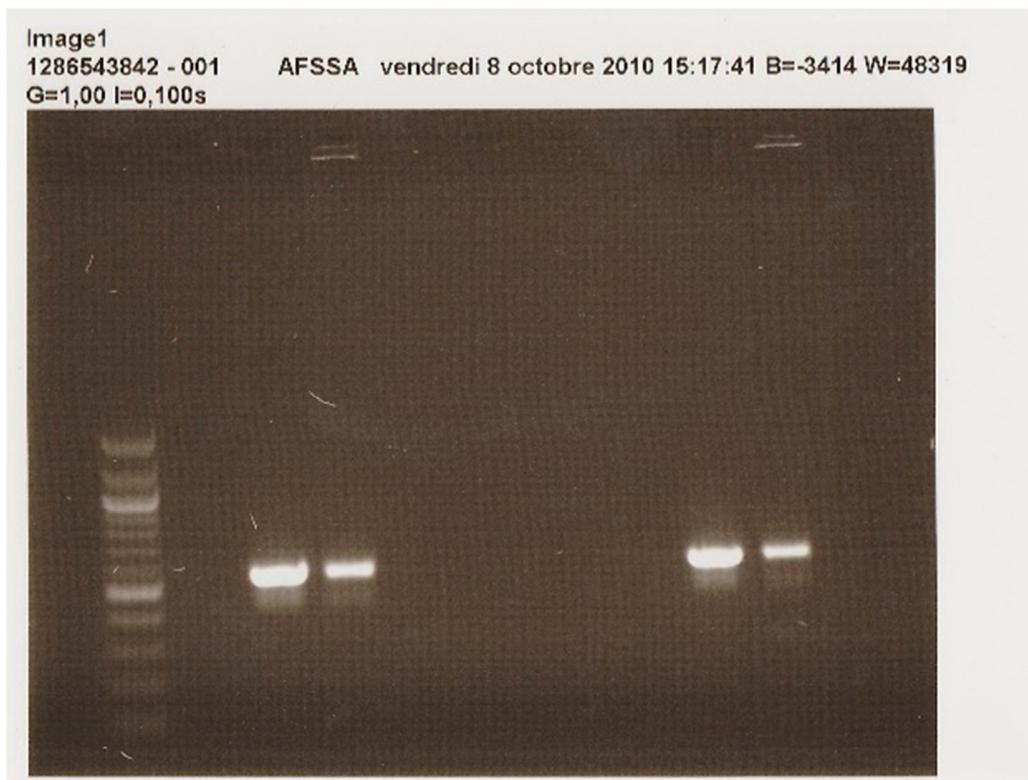
Méthode :

- Allumer le logiciel analyseur d'image et le «Gbox »,
- Eteindre le générateur,
- Retirer puis nettoyer avec un papier absorbant le couvercle de la cuve,
- Sortir la plaque contenant le gel de la cuve d'électrophorèse,
- Éliminer le maximum de BET à l'aide d'un papier absorbant,
- Déposer délicatement le gel sur la table UV du « Gbox » en le faisant glisser de la plaque,
- Enlever les bulles en dessous du gel en appuyant légèrement dessus,
- Fermer l'appareil.

2.5.2 Résultats obtenus avec une souche virulente de référence

Cet essai a été réalisé le 8 octobre 2010. Il a mis en évidence la présence du plasmide de virulence vap A d'une souche de *Rhodococcus equi* de référence (photographie n° 41).

Photographie n° 41: Résultats de la PCR après révélation par la Gbox



3 Étude expérimentale

Après avoir mis au point une technique de quantification de *Rhodococcus equi* dans l'air ambiant, nous avons entrepris une étude de terrain.

3.1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Cette étude a pour ambition de suivre au cours de la saison 2011 la quantité de *Rhodococcus equi* dans l'air et dans le sol dans plusieurs surfaces pour deux haras ayant un statut bien distinct vis-à-vis de la rhodococcose. Le premier nommé H1 est un haras sain n'ayant pas rencontré de cas de rhodococcose ces dernières années. Le deuxième nommé H2 est un haras contaminé rencontrant de nombreux cas de rhodococcose chaque année.

Le premier objectif est donc de valider la méthode et le protocole que nous avons développés. Il faut tout d'abord valider la mise en œuvre de la technique sur le terrain, c'est-à-dire vérifier la faisabilité des prélèvements sur le terrain : installation de la machine ou organisation compatible avec la vie du haras. D'autre part, cette étude doit permettre de mettre en évidence des différences notables entre les haras notamment en ce qui concerne la présence de *Rhodococcus equi* dans l'air.

Cette étude comprend également des mesures de la poussière dans l'air. Ces mesures doivent permettre de déterminer s'il existe une corrélation entre la quantité de poussières présente dans l'air et la concentration en *Rhodococcus equi*. En effet, la présence de poussières apparaît comme un facteur de risque déterminant dans l'infection à *Rhodococcus equi* selon plusieurs études (Smith et Robinson, 1981; Tapprest *et al.*, 2012). Les techniques développées devraient nous permettre d'objectiver cette relation.

Enfin, cette série de mesures a pour objectif de mettre en évidence le type de prélèvements qui seraient les plus discriminants entre ces deux haras afin de préparer un protocole réduit qui pourrait être utilisé dans une enquête à plus grande échelle. Cette enquête dans un grand nombre d'élevages aurait pour but d'établir d'éventuels liens statistiques entre la prévalence de la rhodococcose dans un élevage et les quantités de *Rhodococcus equi* retrouvées dans le sol ou dans l'air de ce haras.

3.2 MATÉRIEL

3.2.1 Critères de sélection des haras

Nous avons établi un ensemble de critères nécessaires au bon déroulement des séances de prélèvements et à la qualité de la comparaison.

En ce qui concerne les haras, ces derniers doivent être assez similaires en dehors de leur statut sanitaire. Pour ce qui est du statut vis-à-vis de la rhodococcose, le haras sain H1 ne doit jamais avoir rencontré de cas de rhodococcose au sein de l'élevage. Le haras contaminé H2 doit quant à lui rencontrer plusieurs cas de rhodococcose chaque année. De plus, ces cas doivent être documentés par des examens complémentaires. Il doit s'agir de deux structures ayant la même vocation et de même taille. En ce qui concerne leur localisation, pour des raisons pratiques, ils ne doivent pas être situés à plus d'une heure de route du laboratoire de l'Anses Dozulé. Les surfaces rencontrées dans les deux haras doivent être de même nature afin de pratiquer des mesures sur des surfaces similaires. Enfin, le personnel du haras doit se montrer suffisamment disponible et compréhensif pour pouvoir nous accueillir pendant la durée de l'étude.

3.2.2 Présentation des haras retenus

Ainsi les deux haras sont situés à moins de trente kilomètres du laboratoire de l'ANSES Dozulé. Ce sont deux structures professionnelles dédiées exclusivement à l'élevage des chevaux purs sang destinés aux courses. Il n'y a pas de pré-entraînement au sein de ces élevages. Les deux haras font appel à la même clinique vétérinaire.

Le haras H1, réputé sain, s'étend sur 75 hectares dont 55 sont consacrés aux chevaux. Au maximum, le haras H1 accueille 50 chevaux et 16 poulains sont nés lors de la saison 2011. Les jeunes ont accès à 45 hectares des 55 hectares de prairies. Cela fait plus de 40 ans que des chevaux sont élevés sur ces terres. Aucun cas de rhodococcose n'a été diagnostiqué. Depuis le début des années 1990, lors de la reprise du haras par les actuels propriétaires, il n'y a eu qu'un seul cas suspect en 2005 ; il s'agissait d'un poulain introduit sur le haras. Ni les poulinières, ni les poulains ne sont vaccinés contre la rhodococcose. Toutes les poulinières sont résidentes ; il n'y a pas de poulinières provenant de l'extérieur. Parmi les poulinières, la moitié reste au haras toute l'année y compris pour le poulinage. L'autre moitié pouligne à l'extérieur et quitte le haras 1 mois avant le terme pour le regagner 42 jours après le diagnostic de gestation positif. Ces juments ont pouliné en Angleterre et en Irlande pour cette saison 2011. Pour les chevaux revenant de l'extérieur, une quarantaine de deux semaines est appliquée dans une zone dédiée avant de les remettre avec les autres chevaux. Il n'y a pas d'étaillon stationné au haras et il n'y a pas non plus de barre de contention dédiée au suivi gynécologique. En ce qui concerne les médicaments prescrits au haras, l'usage des antibiotiques est rarissime et les vermifuges utilisés sont des produits phytosanitaires à base d'ail.

Le haras H2, réputé atteint, s'étend sur 60 hectares dont 56 sont des prairies consacrées aux chevaux. En pleine saison, le haras H2 accueille 70 chevaux et 23 poulains sont nés lors de la saison 2011. Les juments suitées évoluent sur 25 de ces 56 hectares. Le haras existe depuis plus d'une trentaine d'année. Depuis 2006, il rencontre des cas récurrents de rhodococcose. Ainsi, ont été comptabilisés : 1 cas en 2006, 1 cas en 2007, 1 cas en 2008, 4 cas en 2009 et 8 cas en 2010. Parmi les poulains atteints en 2010, 5 sont issus de juments résidentes et 3 de juments extérieures. Initialement, le diagnostic de suspicion clinique a été confirmé par isolement de la bactérie sur prélèvement trans-trachéal. Depuis que les suspicions cliniques se sont multipliées, les modalités diagnostiques utilisées sont la numération formule (leucocytose, neutrophilie) et le dosage du fibrinogène fréquemment associés à l'échographie pulmonaire. En ce qui concerne le traitement, les poulains reçoivent de la tulathromycine (Draxxin®) et de la rifampicine (Rifadine®) pour une durée de traitement de 15 jours avec contrôles hématologiques hebdomadaires. Ce traitement peut se poursuivre jusqu'à 2 mois si nécessaire. Ni les poulinières, ni les poulains ne sont vaccinés contre la rhodococcose. Pour la saison 2011, y a 22 juments résidentes et 15 juments extérieures. Depuis la saison 2008, les poulinières résidentes et extérieures sont sorties dans des prairies distinctes. Il y a 3 étalons stationnés au haras, de nombreuses juments extérieures fréquentent le haras le temps de la saillie. Un box abritant une barre de contention est dédié au suivi gynécologique des juments. Les poulains accompagnent leurs mères lors de ce suivi. Pour ce qui est des traitements antibiotiques prescrits au haras, la pénicilline, l'association triméthoprime-sulfamide et le ceftiofur sont utilisés en routine.

3.2.3 Choix des différentes surfaces

Avant de débuter notre étude, nous avons réalisé une visite de chaque élevage au début du mois de mars 2011. Cette visite nous a permis d'exposer aux éleveurs la technique développée et de discuter des modalités de prélèvements. Cette visite a également été l'occasion de recueillir les informations nécessaires pour chaque élevage et de s'assurer que les haras correspondaient bien aux critères définis. Enfin cette rencontre avait pour but le repérage de surfaces similaires dans les deux haras. Nous avons envisagé de mener nos mesures dans 3 surfaces distinctes sur lesquelles les poulains passent l'essentiel de leur temps sur le haras. Ainsi nous pourrons comparer les trois surfaces que sont le box, le paddock et le champ.

D'une manière générale, les box sont des espaces confinés carrés d'environ 4 mètres de côté. Ils sont paillés au sol et sont fermés par un plafond. Un point d'eau et une mangeoire permettent au cheval de s'alimenter. Le foin peut être distribué au sol ou dans un râtelier. Les poulains naissent le plus souvent au box et y restent les premières heures de leur vie. Par la suite, les poulains et leurs mères passent les nuits au box. Nous avons demandé que le box ne soit pas fraîchement curé lors de nos prélèvements. Ainsi les box ne sont pas paillés le matin même. Nous avons seulement réalisé nos mesures lors d'un curage et paillage de box dans le cadre d'expériences complémentaires. Le paddock est un espace extérieur clos de taille modeste utilisé comme espace de détente. Il est le plus souvent associé à une couverture en herbe peu dense et inclut donc souvent des endroits poussiéreux. Cette surface modeste permet de sortir une jument et son poulain. Enfin le champ est un espace plus vaste dont la couverture en herbe est généralement plus généreuse que celle du paddock ce qui leur permet de s'alimenter. Cet espace permet de sortir en même temps plusieurs juments et leurs poulains. Nous avons donc choisi ces

trois surfaces aux caractéristiques différentes car le poulain est amené à vivre une partie importante de ses premiers mois sur chacune d'entre-elles (photographies n° 42 et n° 46).

Photographie n° 42: Vues aériennes du haras H1 présentant les différents sites de prélèvements



Photographie n° 43: : Prélèvement dans le box du haras H1



Les juments et leurs poulains sont dans les box autour de la cour principale. Les box sont tous semblables exceptés un box de poulinage de dimensions supérieures. Le sol est en béton et tous les box sont paillés (photographie n° 43). Une porte donne sur l'extérieur. Les crottins sont retirés quotidiennement et les box sont entièrement vidés tous les lundis et sont nettoyés au lavage haute pression 4 fois par an. Les box sont également entièrement curés et nettoyés au lavage haute pression après la mise bas ou tout changement de jument.

Photographie n°44: Prélèvement dans le paddock du haras H1



Le paddock du haras H1 est un espace clos de 53 x 35 mètres. C'est une ancienne carrière de sable qui a été recouverte de terre. Il y a un point d'eau à l'entrée ainsi qu'une pierre à sels minéraux au centre. Seuls une jument et son poulain sont sortis à la fois dans ce paddock (photographie n° 44). Ce paddock permet des sorties brèves en extérieur dans un espace restreint.

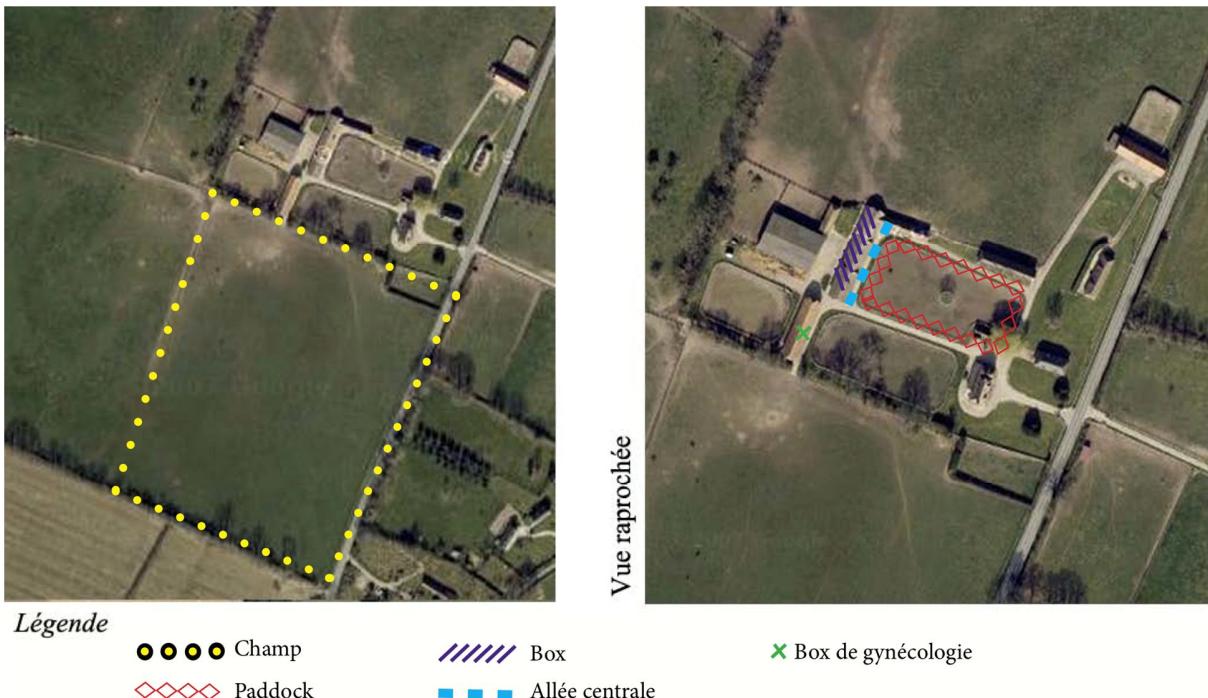
Photographie n° 45: Prélèvement dans le champ du haras H1



Le champ a une superficie de 3 hectares (photographie n° 44). Il est équipé d'un bac à eau et d'une pierre à sels. Le nombre maximum de couples juments-poulains sortis simultanément dans ce champ est de 6. Au début du printemps, les chevaux restent au champ la journée et sont rentrés au box pour la nuit. A l'arrivée des beaux jours, le rythme s'inverse et les chevaux passent une partie de la journée au box et sont laissés au champ la nuit.

Les prairies sont traitées selon des principes de bioagriculture. Ainsi elles sont pulvérisées avec du silicium hautement dilué dans de l'eau. Les crottins sont ramassés au moins tous les mois à l'aide d'un quad et d'un aspirateur. Enfin, une allée centrale en asphalte relie la cour centrale à l'entrée du champ. Elle est empruntée quotidiennement par les juments et leurs poulains qui vont au champ.

Photographie n° 46 : Vues aériennes du haras H2 présentant les différents sites de prélèvements



Photographie n° 47: Prélèvement dans le box du haras H2



De la même manière que dans le haras H1, les juments et leurs poulains sont dans les box autour de la cour principale. Le sol est en béton et tous les box sont paillés (photographie n° 47). Une porte donne sur l'extérieur. Les crottins sont retirés quotidiennement et les box sont entièrement vidés toutes les semaines.

Photographie n° 48: Prélèvement dans le paddock du haras H2



Photographie n° 49: Prélèvement dans le champ du haras H2



Le paddock du haras H2 est un espace clos de 50 x 80 mètres. Il y a un point d'eau à l'entrée. Seuls une jument et son poulain sont sortis à la fois dans ce paddock (photographie n° 48). L'éleveur a remarqué au cours des années précédentes que les poulains placés dans ce paddock étaient souvent sujet à la rhodococcose. Ainsi depuis 2 ans, seuls les chevaux résidents sont placés dans ce paddock. Les juments extérieures et leurs poulains ne sont pas sortis au paddock.

Le champ a une superficie de 5,3 hectares. Il est équipé d'un bac à eau à proximité de l'entrée. Le nombre maximum de couples juments-poulains sortis simultanément dans ce champ est de 12 (photographie n° 49). En général, les chevaux passent la nuit au box et sont sortis au champ pour la journée. L'éleveur a remarqué que les poulains qui sortaient dans ce champ étaient préférentiellement atteints par la rhodococcose. Depuis 2 ans, seules les juments résidentes et leurs poulains sont sorties dans ce champ.

Nous avons donc privilégié la réalisation des prélèvements sur un champ et un paddock sur lesquels l'éleveur avait remarqué que les poulains lui semblaient davantage atteints.

Enfin, une allée en asphalte se situe en bordure des box et est empruntée par les juments et leurs poulains pour se rendre au box dans lequel se tient le suivi gynécologique mais également pour se rendre au champ. Il n'y a pas d'aire d'attente à l'entrée du box de gynécologie.

3.3 MÉTHODE

3.3.1 Organisation de l'étude

Nous avons mené cette campagne de prélèvements tout au long du printemps. En effet, la rhodococcose apparaît à partir de fin avril et sa prévalence augmente par la suite jusqu'en juillet (Mauger, 2009). La période d'incubation a été estimée entre 1 et 3 semaines (Giguère *et al.*, 1999; Barton, *et al.*, 1987), il nous paraissait donc judicieux de débuter notre campagne dès le début du mois d'avril. Nous avons souhaité revenir régulièrement afin de suivre l'évolution des paramètres mesurés. Ainsi nous avons programmé 6 séances pour chaque haras soit 12 journées de prélèvements. La durée de prélèvement est de 90 minutes par surface. Cette durée optimale autorise la réalisation des prélèvements sur 3 surfaces différentes dans la journée. En revanche, ne disposant que d'une seule équipe et des 3 Capteurs Individuels de Particules, il nous été impossible de réaliser les séances de prélèvements dans les deux haras la même journée. Nous les avons donc toujours mené sur deux journées successives en prévoyant de débuter par le haras sain H1 puis de consacrer la deuxième journée au haras contaminée H2. Les dates des séances sont donc les 7 et 8 avril, 20 et 21 avril, 6 et 9 mai, 18 et 19 mai, 30 mai et 1^{er} juin, 16 et 17 juin.

Pour ce qui est des deux premières séances dans chaque haras, nous avons mesuré la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air alvéolaire ainsi que la concentration pondérale en poussière dans l'air alvéolaire. Cependant, nous avons rencontré des difficultés en ce qui concerne les mesures de poussières alvéolaires. En effet, il nous est arrivé d'obtenir des concentrations de poussières alvéolaires nulles voire parfois faiblement négatives, événement qui ne s'était jamais produit lors de notre pré-étude. Ceci est très probablement dû aux variations d'hygrométrie que subit notre local de pesée. En effet, il n'est pas thermostaté. Par conséquent nous avons décidé d'amender le protocole en privilégiant une mesure de la concentration massique de poussières dans l'air total. Ainsi nous avons fait l'acquisition d'un troisième CIP pour assurer la mesure de la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air total. Désormais nous pouvons mesurer simultanément les concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air total, alvéolaire et la concentration pondérale de poussière dans l'air total.

3.3.2 Protocoles retenus

3.3.2.1 Relevé des conditions climatiques et des conditions de terrain

Nous avons attaché une importance toute particulière à ce relevé. Pour ce qui est du relevé des conditions climatiques, nous avons relevé sur place pour chaque prélèvement la température ambiante, l'hygrométrie ainsi que la vitesse du vent grâce à la sonde LM-800 distribuée par CONRAD®. Nous avons également recueilli des données mesurées par des stations voisines de météo France. Ainsi nous nous sommes procurés les valeurs de températures moyennes sur la journée ainsi que la pluviométrie quotidienne de mars à juillet et les valeurs de pluviométrie horaire pour les jours de prélèvement.

Pour chaque haras, nous avons choisi une station à proximité car des écarts importants de pluviométrie peuvent exister avec l'éloignement du haras. Pour le haras H1, les données proviennent de la station météorologique de Beaumont-en-auge, située à 140 mètres d'altitude, dont l'indicatif est 14055002. Pour le haras H2, les données météorologiques sont celles de la station de Saint-Gatien-des Bois, située à 139 mètres d'altitude, dont l'indicatif est 14578001.

En ce qui concerne le relevé des conditions de terrain, nous avons enregistré pour chaque séance les heures auxquelles se déroulent les prélèvements ainsi que l'état des surfaces: c'est-à-dire la surface d'enherbement, l'impression visuelle du niveau de poussière la présence de crottins ou le niveau de propreté de la litière (annexes n° 11 et n° 12). Enfin, nous avons documenté tous les séances de prélèvements avec des photographies et des séquences vidéo. Ces images permettent d'archiver l'état des sols notamment, un aperçu des conditions climatiques et des juments porteuses des appareils.

3.3.2.2 Quantification de Rhodococcus equi en aérosols dans l'air alvéolaire et total

Matériel :

- CIP 10 MR et le CIP 10 M,
- Piluliers en plastique identifiés,
- Gants,
- 6 Tubes contenant 2,5 ml de BHI (2 jokers),
- 4 Buses, 4 carters, 4 coupelles rotatives (pour les 2 CIP),
- 2 têtes de CIP, 2 sélecteurs, 2 mousses « sélecteur », 2 mousses « impacteur » (pour le CIP 10 MR),
- Licol / Baudrier, pochettes Rhodopopus et ses lanières.

Méthode :

- Une fois les coupelles posées sur leurs axes dans les CIP, introduire un volume de 2,5 ml de BHI,
- Monter ensuite les têtes du CIP 10 MR et CIP 10 M en plaçant des mousses impacteur et sélecteur neuves puis maintenir les CIP en position verticale,
- Une fois la jument suitée présente sur la surface désirée et tenue en licol, démarrer les CIP 10 M et 10 MR à l'aide de l'aimant,
- Fixer les CIP 10 M et CIP 10 MR en position subverticale sur les montants du licol, respectivement à gauche et à droite, à l'aide de la pochette Rhodopopus et de ses lanières,
- Libérer la jument suitée,
- Après 1h30 de temps de prélevement, attraper la jument suitée et décrocher les CIP,
- Ouvrir les pochettes Rhodopopus et arrêter les CIP grâce à l'aimant.

Le changement des coupelles, têtes, liquides, carters et mousses des CIP se réalise à l'abri du vent dans un endroit sec, avec des gants non talqués. Les coupelles à liquide et les coupelles contenant les mousses en polyuréthane sont rangées dans les piluliers en plastique refermés afin de limiter une éventuelle contamination. Les piluliers contenant les coupelles à liquide doivent être maintenus à la verticale pour éviter toute perte de liquide.

Photographie n° 50: Sites de fixation des CIP sur la tête de la jument. À sa droite le CIP 10 MR. A sa gauche, le CIP 10 latéralement et le CIP 10 M médialement



Photographie n° 51: Conditionnement des coupelles de prélèvement et préparation des CIP pour prélèvements suivants dans le coffre de la voiture



3.3.2.3 Quantification des poussières totales en aérosols

Matériel :

- CIP 10,
- 3 buses, 3 carters stériles,
- Mallette (tournevis, aimant),
- Gants non talqués,
- Piluliers en plastique identifiés,
- Licol / baudrier, pochette Rhodopopus et ses lanières,
- 18 coupelles rotatives contenant mousses en polyuréthane (toutes sauf la 6, 7 et la 13 qui restent en salle de pesée).

Méthode :

Ce prélèvement se fait à l'aide du CIP 10 fixé sur le licol de la jument grâce à la pochette Rhodopopus. Chaque prélèvement est réalisé sur une durée de 1h30 afin de collecter 900 litres d'air. La mise en route de l'appareil s'effectue à l'aide d'un aimant. Le site de fixation du CIP 10 est présenté sur la photographie n° 50.

3.3.2.4 Quantification de Rhodococcus equi dans les sols

Nous prélevons le sol à trois endroits distincts et à 4 profondeurs différentes (surface, 5 cm, 20 cm et 50 cm de profondeur) pour chaque site. Nous avons retenu deux zones sollicitées présentant un défaut d'enherbement: l'entrée et l'auge. Le terme auge désigne ici la zone où se situe l'abreuvoir ou la pierre à sels. Le troisième prélèvement a été réalisé au centre du paddock dans une zone correctement enherbée.

Matériel :

- Tarière, Piluliers en plastique identifiés, Gants.

Méthode :

À l'aide d'une tarière préalablement lavée avec de l'eau et désinfectée avec de l'Argospray®, prélever la terre en surface, à 5 cm, à 20 cm et à 50 cm de profondeur avec des gants non talqués et la mettre dans un pilulier identifié. Une fois les prélèvements réalisés, prendre le soin de bien refermer les « trous » réalisés pour éviter tout danger pour les chevaux. Les sites de prélèvements sont présentés aux photographies n° 52 à n° 57 pour le haras H1 et n° 58 à n° 63 pour le haras H2.

Photographie n° 52: Site de prélèvement du sol à l'entrée du paddock du haras H1



Photographie n° 55: Site de prélèvement du sol à l'entrée du champ du haras H1



Photographie n° 53: Site de prélèvement du sol à l'auge du paddock du haras H1



Photographie n° 56: Site de prélèvement du sol à l'auge du champ du haras H1



Photographie n° 54: Site de prélèvement du sol au centre du paddock du haras H1



Photographie n° 57: Site de prélèvement du sol au centre du champ du haras H1



Photographie n° 58: Site de prélèvement à l'entrée du paddock du haras H2



Photographie n° 61: Site de prélèvement à l'entrée du champ du haras H2



Photographie n° 59: Site de prélèvement à l'auge du paddock du haras H2



Photographie n° 62: Site de prélèvement à l'auge du champ du haras H2



Photographie n° 60: Site de prélèvement au centre du paddock du haras H2



Photographie n° 63: Site de prélèvement au centre du champ du haras H2



3.3.2.5 Recherche de *Rhodococcus equi* au sol grâce aux lingettes

Matériel :

- 2 ou 3 Chiffonettes spécifiques *Grosseron*
- 2 ou 3 Piluliers en plastique identifiés

Méthode :

A l'aide d'une chiffonette spécifique *Grosseron*, nous récoltons les poussières sur un lieu de passage des chevaux et dans le box où le prélèvement d'air s'effectue. Les bactéries récoltées dans les poussières survivent et se multiplient dans la chiffonette imprégnée d'eau peptonée à 10 %. Ce liquide constitue un milieu de transport pour les bactéries.

Photographie n° 64: Réalisation d'un prélèvement avec une lingette sur une allée fréquentée par les poulains du haras H2



- Mettre les gants puis sortir la chiffonette de sa pochette et la déplier,
- Étaler la chiffonette sur la zone à prélever,
- Mettre en contact la chiffonette avec le sol en appuyant légèrement sur celle-ci afin de récupérer le maximum de poussières,
- Répéter la même opération,
- Enrouler la chiffonette et l'introduire dans le pilulier identifié.

3.3.2.6 Quantification de *Rhodococcus equi* dans les fèces

Matériel :

- Gants de fouille identifiés

Méthode :

Nous récoltons les fèces des juments et des poulains. Les fèces frais sont récoltés à l'aide de gants de fouilles en prenant soin d'en prélever à différents endroits du crottin pour une meilleure représentativité de l'échantillon. Nous n'avons pas prélevé les fèces par écouvillonnage rectal car cela présente un risque trop important de perforation rectale et nous avons toujours travaillé avec des crottins frais. Les prélèvements de crottins sont ensuite placés dans une glacière pour le retour au laboratoire.

3.3.3 Organisation d'une séance de prélèvement

3.3.3.1 Opérations préliminaires

Avant chaque séance de prélèvement, nous téléphonons au haras pour rappeler notre visite. Pour ce qui est du matériel, nous chargeons la voiture le jour même des consommables et des pièces autoclavées au préalable. Ainsi les éléments constituant les 6 têtes des CIP et leurs 6 coupelles rotatives sont autoclavées la veille du jour de prélèvement. Les mousses rotatives nécessitent une préparation toute particulière.

3.3.3.2 Préparation des mousses rotatives et détermination de leurs masses

La préparation des mousses est délicate. Nous avons suivi le protocole proposé par l’Institut National de Recherche et de Sécurité (fiche 085 Métropol) Nous présentons ici les étapes de cette préparation en prenant comme repère le jour J, jour du prélèvement.

Matériels :

- CIP 10 (Capteur Individuel de Poussières),
- Gants en nitrile (non talqués),
- Mousses en polyuréthane et leurs coupelles numérotées avec leurs couvercles respectifs numérotés,
- Pince,
- 1 Buse, 1 carter,
- Papier aluminium, Tournevis,
- Étuve à + 50 °C,
- Balance de précision au 10^{ème} de milligramme (*Analytical Standard Ohaus®*),
- Eau déionisée et savon liquide.

Protocole:

J-2

- Laver les mousses à l'eau savonneuse tiède et les presser plusieurs fois pendant le lavage et les premiers rinçages. Rincer au moins 5 fois à l'eau déionisée filtrée,
- Laver séparément les coupelles avec leur couvercle,
- Faire sécher les mousses et les coupelles à l'étuve en les plaçant sur un plateau propre pendant 12 h à environ 50 °C.

J-1

- Placer les mousses propres dans une coupelle au moyen d'une pince,
- Ouvrir les coupelles et placer le couvercle sous la coupelle ouverte. Les mettre pendant 4 heures dans l'étuve à 50 °C,
- Conditionner ensuite les coupelles par un séjour d'une nuit dans le local de pesée.

J, 8h00

- Avant la pesée des coupelles, tarer correctement la balance,
- Peser chaque coupelle repérée et enregistrer la valeur affichée après amortissement des oscillations. Pour la pesée, disposer la coupelle sur le couvercle pour minimiser l'instabilité,
- Intercaler la pesée des coupelles servant de témoins dans la série de pesée des autres coupelles,
- Effectuer le relevé d'hygrométrie et de température de la salle de pesée,
- Consigner toutes les mesures sur la feuille de prélèvement.

3.3.3.3 Présentation d'une journée type de prélèvement

Afin de comprendre le déroulement d'une journée de prélèvements, nous vous présentons ci-dessous les opérations menées à chaque séance ainsi que les horaires théoriques.

8h00 : Pesée des mousses rotatives avec la balance de précision,
9h : Montage des CIP au laboratoire pour le 1^{er} prélèvement et chargement de la voiture,
9h30 : Départ,
10h : Arrivée dans le Haras,
10h15 : Fixation des CIP sur une jument suitée pour le prélèvement dans le paddock,
10h30 – 11h : Prélèvements de terre dans le paddock,
11h – 11h40 : Prélèvements dans le box des crottins des juments et poulains,
11h45 : Fin du prélèvement au paddock. Démontage des CIP et conditionnement des prélèvements. Préparation de nouvelles têtes de CIP,
12h : Fixation des CIP sur une jument suitée pour le prélèvement au box,
12h15 : Échantillonnage du sol du box avec une chiffonnette,
12h30 : Pause déjeuner,
13h : Chiffonnette dans l'allée principale, fréquentée par les juments et chiffonnette à l'entrée du box de gynécologie dans le haras H2,
13h30 : Fin du prélèvement au box. Démontage des CIP et conditionnement des prélèvements. Préparation de nouvelles têtes de CIP,
13h45 : Fixation des CIP sur une jument suitée pour le prélèvement dans le champ,
14h – 14h30 : Prélèvements de terre dans le champ,
14h30 – 15h10 : Prélèvements des crottins juments et poulains dans le champ,
15h15 : Fin du prélèvement au champ. Démontage des CIP et conditionnement des

prélèvements,

16h00 : Retour au laboratoire,

16h -18h00 : Traitements des prélèvements. Les prélèvements réalisés avec les CIP 10 M et CIP 10 MR, les lingettes ainsi que les prélèvements de fèces sont mis en culture. Les prélèvements de terre sont conservés à +4 °C pour être ensemencés le lendemain. Les mousses rotatives utilisées sur le terrain sont conditionnées en salle de pesée.

3.3.3.4 Opérations de retour au laboratoire

De retour au laboratoire, le matériel et les consommables sont rangés. La tarière Edelmann, les pochettes Rhodopopus, les lanières de fixation en cuir et les corps des CIP sont nettoyés puis désinfectés avec de l'Argospray®. Les volumes de BHI restant dans les coupelles métalliques des CIP 10 M et CIP 10 MR sont collectés à l'aide d'une pipette graduée puis déposé dans des tubes stériles identifiés. Les valeurs sont soigneusement notées. Ce volume intervient de manière déterminante dans le calcul de la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air. Ensuite, les éléments formant chacune des 6 têtes de CIP ainsi que les 6 coupelles métalliques sont nettoyés puis autoclavés pendant 45 minutes puis emballés dans du papier d'aluminium. Les mousses rotatives utilisées pour les prélèvements et les 3 témoins « terrain » ont été conditionnées fermées dans leur coupelle respective et dans un pot vissable de 200 ml. Ces pots sont ensuite stockés dans la salle de pesée. Le traitement des mousses débute le lendemain après la journée de prélèvement dans le haras H2 afin de pouvoir les traiter ensemble.

3.3.3.5 Analyses des prélèvements au laboratoire

3.3.3.5.1 Analyse bactériologiques des prélèvements

3.3.3.5.1.1 Mise en culture des prélèvements de terre ou de fèces

Matériel :

- Gants à usage unique,
- Balance,
- Bec bunsen,
- Eau distillée,
- Tube de plastique 50 ml à fond conique,
- Étuve et agitateur chauffant,
- Agitateur mécanique,
- Géloses Columbia ANC +5 % de sang de mouton,
- Micropipette Eppendorf ® et cônes,
- Pipette râteau,
- Argospray®.

Protocole :

- Mettre 1 g de terre ou de fèces et 40 ml d'eau distillée stérile dans un tube à fond conique à usage unique de 50 ml,
- Mettre le tube 30 minutes à +37 °C sous agitation,
- Ensemencer une gélose Columbia ANC au sang de mouton avec 100 µl de la préparation
- Étaler avec une pipette râteau,
- Mettre la gélose à l'étuve pour 48 heures à +37 °C,
- Dénombrer les colonies de *Rhodococcus equi* sachant qu'une colonie isolée donne 4.10^2 *Rhodococcus equi* / g de terre,
- Isoler ces colonies sur gélose Columbia ANC au sang de mouton,
- Mettre la gélose à l'étuve pour 24 heures à +37 °C,
- Vérifier que les colonies sont bien des colonies de *Rhodococcus equi*.

3.3.3.5.1.2 Mise en culture des prélèvements effectués avec les lingettes

Matériel :

- Eau physiologique stérile (40 ml par chiffonnette) à 8,5 g/l,
- Gélose sang + ANC (2 par lingette),
- Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
- Gants,
- Portoir, étuve, agitateur chauffant, PSM et Bec Bunsen.

Méthode :

- Ajouter 40 ml d'eau physiologique stérile directement dans le tube contenant la chiffonnette sous la PSM et Vortexer,
- Laisser sous agitation 30 minutes à + 37 °C,
- Vortexer puis réaliser des étalements de 100 µl et des isolements de 10 µl sur gélose ANC,
- Incuber 24 h à 48 h à + 37 °C.

3.3.3.5.1.3 Mise en culture des prélèvements d'air

Matériel :

- Pipettes graduées, pipettes Pasteur et pipeteur automatique,
- Petits tubes stériles en plastique et portoir,
- Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
- Milieu BHI et gélose ANC + 5 % de sang de mouton,
- Bec Bunsen et PSM,
- Étuve.

Méthode :

- Récupérer le liquide dans la coupelle. Mesurer le volume à l'aide d'une pipette graduée et le transférer dans un petit tube en plastique stérile à boucher,
- Réaliser une dilution à 10^{-1} dans un petit tube en plastique stérile (le plus souvent 100 µl de liquide dans 900 µl de BHI) puis à 10^{-2} dans un autre tube stérile (100 µl de liquide de la dilution à 10^{-1} dans 900 µl de BHI),
- Réaliser un étalement à partir de 100 µl à l'aide d'une pipette râteau sur gélose ANC + 5 % de sang de mouton pour chaque dilution (0 et -1),
- Pour les prélèvements issus de l'air total, ces étalements sont effectués en triplicata pour les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} ,
- Pour les prélèvements issus de l'air alvéolaire, ces étalements sont tous effectués en triplicata (10^0 , 10^{-1} et 10^{-2}),
- Incuber 24 h à 48 h à + 37 °C.

La lecture des toutes les boîtes ensemencées est quotidienne entre J+1 et J+4 après la mise en culture. Les résultats provisoires sont reportés sur un cahier de laboratoire. Une fois clairement visible, les supposées colonies de *Rhodococcus equi* sont repiquées sur une nouvelle gélose ANC +5 % sang de mouton. Une nouvelle lecture a lieu les jours suivants pour confirmation. Ensuite, les colonies de *Rhodococcus equi* isolées sont disposées dans des tubes et sont conservées dans un tube conique à PCR dans la souchothèque.

3.3.3.5.2 Analyse de la virulence de *Rhodococcus equi* par Polymerase Chain Reaction

L'analyse de la virulence de *Rhodococcus equi* a été réalisée grâce à la PCR dont le protocole est exposé dans la partie « Recherche et développement » au paragraphe 2.5.1.

3.3.3.6 Détermination de la concentration massique en aérosols

Matériel : Identique à celui utilisé pour la préparation des mousses rotatives et détermination de leurs masses (cf 3.3.3.2).

Protocole :

J+1 :

- Munis de gants en nitrile, et sous un poste de sécurité microbiologique, ouvrir les coupelles et retirer à l'aide d'une pince les gros éléments qui auraient pu se déposer sur la mousse (brindille),
- Placer le couvercle sous la coupelle ouverte,
- Placer les coupelles ouvertes pendant 4 h à l'étuve à +50 °C,
- Conditionner ensuite les coupelles ouvertes par un séjour d'une nuit dans le local de pesée.

J+2 :

- Procéder comme pour les pesées initiales en intercalant les pesées des coupelles témoins et celles des coupelles utilisées.

Un calcul permet ensuite de déterminer la concentration massique des aérosols dans l'air à partir de la différence de masse mesurée. Soient x , le numéro du prélèvement et Q_x la masse d'aérosol (en mg) prélevée sur la mousse en polyuréthane. Soit T_x , les masses des témoins. Soit ΔT_x ou ΔM_x , les variations de masse mesurées.

$$Q_x = \Delta M_x - 1/6 ((\Delta T_1 + \Delta T_2 + \Delta T_3) + (\Delta T_4 + \Delta T_5 + \Delta T_6))$$

Nous comptons donc 3 témoins communs à chaque haras : les témoins de pesée qui restent dans la salle de pesée. En outre chaque haras compte 3 témoins qui lui sont propres. Ces trois témoins sont emportés dans le haras lors de la séance de prélèvement. La concentration pondérale de l'aérosol dans l'atmosphère prélevée C_x (en g/m^3) est exprimée ainsi :

$$C_x = Q_x / V \quad \text{où } V \text{ est le volume d'air prélevé exprimé en } \text{m}^3.$$

3.3.3.7 Constitution d'une souchothèque

Après leur mise en culture et leur isolement, chaque colonie de *Rhodococcus equi* est prélevée et placée dans un tube en plastique contenant des perles. Ce tube est ensuite identifié et conservé à -80 °C dans une souchothèque. La constitution de cette souchothèque permet un archivage de toutes les souches de *Rhodococcus equi* prélevées au cours de cette campagne. Cela permet de disposer de souches de *Rhodococcus equi* pour des expériences in vitro.

3.3.4 Mode de collecte des informations sur les chevaux

3.3.4.1 Identité des chevaux

Les informations concernant l'identité des chevaux ont été obtenues auprès des éleveurs. Nous avons ainsi collecté le nom, la date de naissance, le sexe et le statut de chaque individu ayant participé à l'étude qu'il soit jument suétée ou poulain. La majorité de ces informations a été collectée au cours de la première séance. Nous avons par la suite eu l'occasion de nous familiariser avec chaque individu que ce soit lors du ramassage des crottins ou lors de la fixation des appareils de prélèvement. Par la suite ces informations ont été compilées dans un tableau Excel puis envoyées au secrétariat de chaque haras afin de subir une dernière vérification.

3.3.4.2 Renseignements médicaux

En ce qui concerne les informations médicales, celles-ci nous sont parvenues au fur et à mesure en suivant les poulains suspects de rhodococcose. À la fin de l'étude, les vétérinaires de la clinique de la Côte Fleurie nous ont transmis le dossier médical de chaque poulain ayant été affecté par la rhodococcose. Ce dossier comprend les signes cliniques observés, les modalités et la date du diagnostic, la nature et la durée du traitement, ainsi que résultats des examens hématologiques et biochimiques réalisés au début de la suspicion, lors du suivi et après la rémission.

3.3.5 Méthode de traitement des données collectées

3.3.5.1 Résultats obtenus

Nous avons présenté les résultats sous deux formes. La première est une fiche récapitulant les conditions climatiques, les résultats bactériologiques et de PCR pour les prélèvements dans le sol et dans l'air ainsi que les masses des mousses rotatives avant et après prélèvement. Il y a une fiche par séance et par haras, ce qui ne permet pas d'avoir une vision synthétique pour comparer des valeurs entre séances ou suivre une évolution sur toute la saison. En revanche, ces fiches se sont révélées très pratiques pour noter les résultats obtenus sur le terrain ou en laboratoire. Un modèle de cette fiche est présenté en annexe n° 6 avec les données collectées pour le haras H2 le 19 mai 2011. Ces résultats sont également consignés dans un cahier de laboratoire afin d'en garder une copie en cas de perte des feuilles de résultats. Enfin, l'intégralité des données a été compilée dans un tableau Excel. Ces tableaux sont présentés en annexes n° 7 à n° 19.

3.3.5.2 Exploitation des résultats et outils statistiques

L'utilisation de tableaux croisés dynamiques a parfois facilité la mise en évidence de tendances. Il s'agit de tableaux modulables qui permettent de hiérarchiser les données selon les paramètres définis. Les statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statel version 2.6. Ce logiciel intégré à Excel minimise ainsi les erreurs liées au transfert des données. La véracité et la justesse des calculs exécutés par ce logiciel sont conformes aux exigences du NIST (National Institute of Standards and Technology). Les conditions d'application ont été vérifiées avant la réalisation des tests statistiques. Il ressort que la limite de cette étude se dessine avec la non-indépendance des prélèvements réalisés. En effet, nous avons effectué des prélèvements dans une même surface à plusieurs localisations et profondeurs. Il est raisonnable de penser que cette non-indépendance est susceptible de majorer le seuil de significativité. Une analyse statistique avec une modélisation mixte aurait permis de s'affranchir de la non-indépendance de nos prélèvements. Nous avons défini « p » comme le seuil de significativité. Le risque d'erreur « α » admis est de 0,05. Nous avons utilisé le test t de Student, le test de Shapiro-Wilk, le test d'indépendance du χ^2 , le test de Mann-Whitney, le test exact de Fisher, le test de Wilcoxon et le test du coefficient de corrélation de Spearman.

3.4 OBSERVATIONS

La campagne de prélèvements s'est correctement déroulée. La réalisation des mesures embarquées avec les CIP ne s'est à aucun moment révélée dangereuse pour les chevaux ou l'opérateur. Il s'est avéré parfois difficile de récupérer la jument porteuse des CIP lors des prélèvements en extérieur, entraînant parfois un allongement de la durée de prélèvement de 5 à 10 minutes. Cependant, cette augmentation de la durée ne représente absolument pas une limite pour l'exploitation de la mesure puisqu'elle représente une augmentation du volume d'air prélevé prise en compte lors des calculs de concentrations massiques en aérosols ou de concentration *Rhodococcus equi* dans l'air.

3.5 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.5.1 Analyse descriptive des données générales des haras

Avant d'effectuer une analyse des données recueillies lors des séances de prélèvements, nous réalisons une analyse descriptive des données générales chiffrées concernant les deux haras. Ces données sont disponibles en annexes n° 13 et n° 14. En effet, différentes études épidémiologiques ont mis en évidence des facteurs de risque de rhodococcose pulmonaire liés à la structure et aux pratiques d'élevages (Chaffin *et al.*, 2003b; Chaffin *et al.*, 2003a; Tapprest *et al.*, 2012). Ces études révèlent notamment comme facteurs de risque : une grande taille d'élevage (en effectifs et/ou en densité d'animaux), la présence de juments de passage, les mélanges d'animaux (juments résidentes et juments de l'extérieur) et les naissances tardives des poulains. Ayant choisi des haras relativement similaires (en dehors de leur statut sanitaire vis-à-vis de la rhodococcose), nous avons souhaité regarder s'ils différaient quant aux facteurs de risque décrits dans la littérature.

Le nombre de juments suitées ayant participé à notre étude est de 16 dans le haras H1 et 21 dans le haras H2. Le nombre total moyen de chevaux à l'année dans le haras H1 est de 45 contre 70 dans le haras H2. En outre, le haras H2 accueille 15 juments qui mettent bas au haras pendant la saison de reproduction. Ces juments proviennent de l'extérieur et ne sont pas la propriété du haras. De plus, 3 étalons sont stationnés au haras H2 pour réaliser des saillies en monte naturelle sur le haras. Cette présence entraîne le passage de juments extérieures au cours de la saison de monte entre février et juin. Ces deux derniers éléments provoquent des mouvements de chevaux plus importants dans le haras H2 que dans le haras H1. Le haras H1 ne possède que des juments résidentes. Cependant, la moitié d'entre elles effectue un séjour à l'étranger pour la saillie. Ainsi pour cette saison de monte 2011, les séjours ont eu lieu en Irlande et au Royaume-Uni. En effet, pour les chevaux de race « pur-sang », l'insémination artificielle interdite, seule la monte naturelle est autorisée. Ainsi, les juments quittent le haras gestantes 1 mois avant le terme, poulinent à l'étranger et reviennent au haras, une fois saillie, 42 jours après le diagnostic de gestation positif. Même si la différence n'est pas patente entre les 2 haras, il semble que le haras H2 ait des effectifs plus importants et que les mélanges d'animaux y soient plus fréquents (même si ces mélanges existent dans le haras H1 mais à l'extérieur du haras). De plus, la présence de juments de passage notamment lors de la saison de reproduction est identifié comme un facteur de risque dans plusieurs études (Chaffin *et al.*, 2003a; Tapprest *et al.*, 2012). Ces juments viennent au haras pour l'élevage ou le poulinage. Elles sont nommées « extérieures » dans notre étude. Le haras H1 ne possède pas de juments extérieures alors que le haras H2 voit une quinzaine de couples jument-poulain extérieurs transiter chaque saison. Cet élément est cohérent avec la littérature.

Nous avons également calculé la densité de chevaux dans chaque haras. Cette densité correspond au rapport entre le nombre de chevaux et la surface à laquelle ils ont véritablement accès en extérieur, c'est-à-dire les prairies et paddocks. Bien évidemment, ce calcul possède certaines limites. Tout d'abord, le nombre de chevaux varie au cours du temps. Il est maximal lors de la saison de reproduction au printemps. De plus, les chevaux ne sortent pas en extérieur toute l'année. Enfin, la gestion des prairies est propre à chaque haras. Aussi, nous avons calculé deux valeurs de densité. La première correspond au rapport du nombre total moyen annuel de chevaux sur la surface en herbe consacrée aux chevaux. Il s'agit d'une densité moyenne annuelle de chevaux (densité 1). La seconde est définie comme le nombre de juments suitées et de poulains présents sur la surface en herbe effectivement consacrée à cette classe de chevaux. Pour le calcul de cette deuxième densité, la valeur retenue est donc celle du nombre de juments et de poulains présents lors de la saison de reproduction afin de prendre en compte l'impact du passage des juments extérieures. En effet, cette période est également celle de l'apparition des cas rhodococcose en élevage. Il s'agit d'une densité maximale de couple mère-poulains (densité 2).

Tableau n° 22: Surfaces et densités pour chaque haras

	H1	H2
Superficie du haras (hectares)	75	60
Surface en herbe consacrée aux chevaux (hectares)	55	56
Surface en herbe consacrée aux juments suitées et leurs poulains (hectares)	30	25
Densité 1 (cheval/hectare)	0,82	1,25
Densité 2 (cheval/hectare)	0,93	2,76

D'après le tableau, nous constatons que les densités de chevaux sont plus élevées dans le haras H2 que dans le haras H1. Ceci est particulièrement vérifié pour la densité 2, c'est-à-dire celle concernant davantage les poulains dans la période à risque. En effet, cette densité 2 est 2,97 fois plus élevée dans le haras H2 que dans le haras H2. D'ailleurs la densité de juments suitées et de poulains (ou de poulains seulement) est un paramètre significativement discriminant entre les élevages indemnes et ceux affectés par les pneumonies attribuables à *Rhodococcus equi* (Chaffin *et al.*, 2003a; Tapprest *et al.*, 2012). Le tableau n° 23 présente la répartition des effectifs au sein de chaque haras.

Tableau n° 23: Répartition des effectifs selon chaque haras (RES : Résidentes ; EXT : Extérieures)

		H1	H2
Juments	RES.	20	22
Poulains		18	20
Juments	EXT.	0	15
Poulains		0	12
Étalons		0	3
Yearling		12	15
2 ans		7	10
Autres (Repos...)		4	5
Total maximum		61	102
Total moyen annuel		45	70

Nous avons examiné les dates de naissance des poulains des haras H1 et H2. Pour ce faire, nous avons utilisé le *test t de Student* (figure n° 8) afin de comparer les dates de naissance moyennes des poulains de chaque haras (nous avons auparavant vérifié que la distribution des naissances suivait une loi normale dans chacun des haras grâce au *test de Shapiro-Wilk*). Le détail de l'analyse statistique est disponible en annexe n° 20.

Les résultats de ce test permettent de rejeter l'hypothèse nulle et d'affirmer que les dates de naissance moyennes des poulains des haras H1 et H2 sont significativement différentes avec un seuil de significativité $p < 0,01$. En conclusion, nous pouvons affirmer que les poulains du haras H1 naissent plus tôt que ceux du haras H2 avec un risque d'erreur inférieur à 1%. A titre indicatif, la date de naissance moyenne des poulains du haras H1 est le 27 février 2011 alors que celle des poulains du haras H2 est le 24 mars 2011. Favoriser des naissances précoces correspond à une recommandation habituelle pour la prévention de la rhodococcose (Giguère *et al.*, 1997, Mauger 2009, Tapprest *et al.*, 2012). En effet, la période la plus à risque d'infection par *R. equi* pour le poulain correspond aux mois les plus secs et les plus chauds. Ainsi, lors de naissance tardive, le poulain aura atteint l'âge de sensibilité maximale - entre 1 et 3 mois - (période durant laquelle l'immunité maternelle aura chuté alors que l'immunité propre du poulain est encore insuffisamment développée) durant les mois chauds.

Figure n° 8: Résultats du test t de Student, illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent le numéro du jour de naissance de l'année 2011. Boîte à moustaches autour de la moyenne

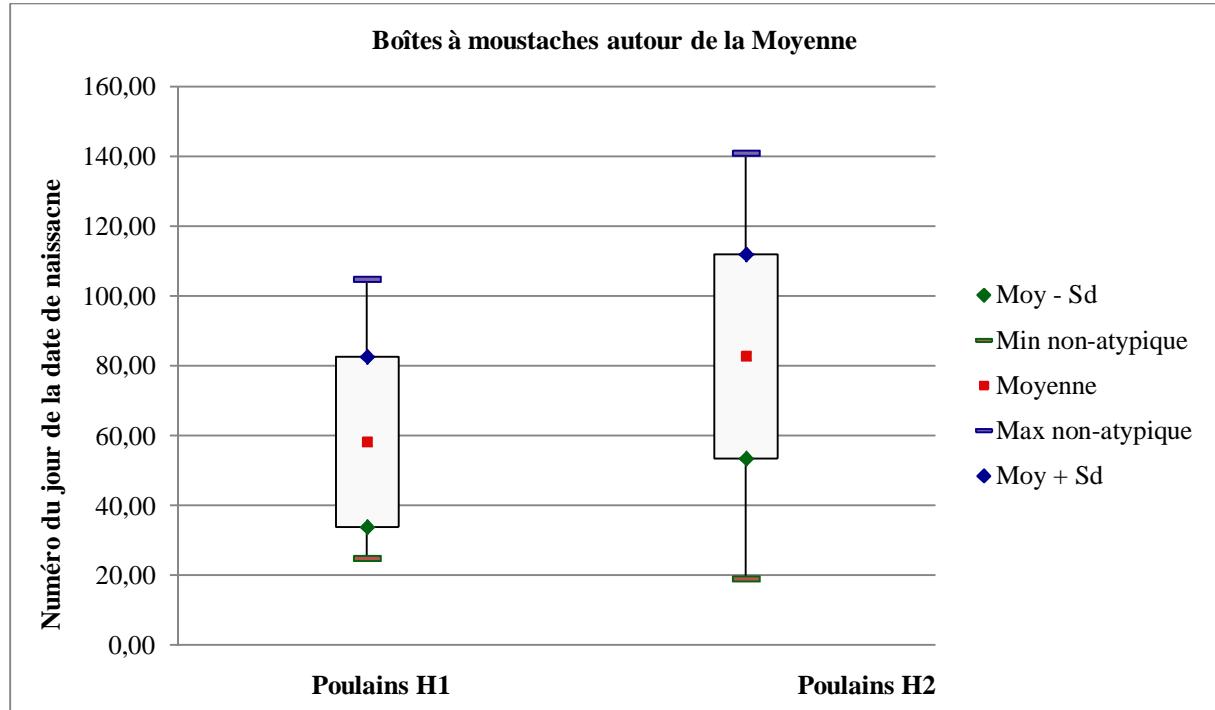


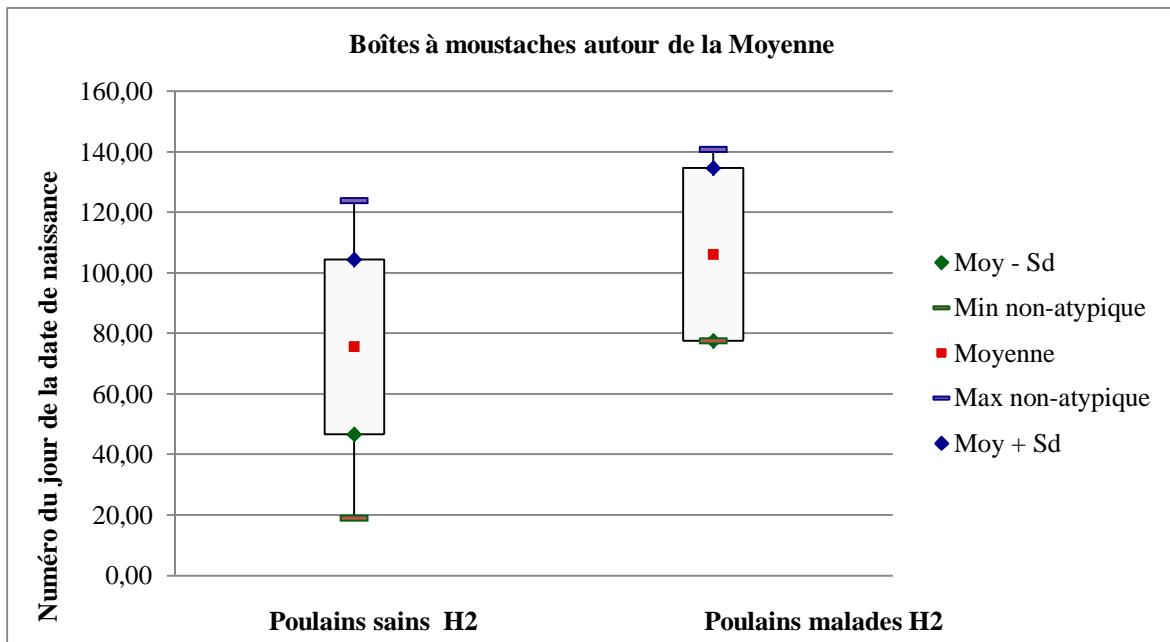
Tableau n° 24: Dates de naissances des poulains du haras H2. Les 5 poulains atteints de rhodococcose sont surlignés en orange

H2	
Code	Date de naissance
H2-P1	31/03/2011
H2-P2	31/03/2011
H2-P3	21/02/2011
H2-P4	07/03/2011
H2-P5	09/03/2011
H2-P6	26/03/2011
H2-P7	01/03/2011
H2-P8	19/01/2011
H2-P9	23/02/2011
H2-P10	26/03/2011
H2-P11	28/04/2011
H2-P12	04/04/2011
H2-P13	21/03/2011
H2-P14	09/03/2011
H2-P15	05/05/2011
H2-P16	23/04/2011
H2-P17	22/03/2011
H2-P18	05/05/2011
H2-P19	21/05/2011
H2-P20	27/03/2011
H2-P21	10/03/2011

Aucun poulain n'a été atteint de rhodococcose dans le haras H1. En revanche, 5 poulains du haras H2 ont été touchés (tableau n° 24). L'incidence annuelle de la rhodococcose au sein de la population de poulains du haras H2 est donc de 23,8%. Au sein du haras H2, nous avons donc comparé les dates de naissance des poulains sains à celles des poulains malades.

Étant donné que le groupe de poulains « malades » comporte un nombre réduit d'individu, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney (figure n° 9). Les résultats de ce test ne permettent pas de rejeter l'hypothèse H0 au risque d'erreur de $p < 0,05$. En conclusion, les dates de naissance moyennes ne sont pas significativement différentes entre le groupe des poulains sains et celui des malades. L'analyse statistique complète est présentée en annexe n° 21. Cependant, il serait souhaitable de pouvoir effectuer cette comparaison sur des groupes ayant des effectifs plus importants.

Figure n° 9: Résultats du test de Mann-Withney, illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent le numéro du jour de naissance de l'année 2011. Boîte à moustaches autour de la moyenne



En effet, la littérature ne relate pas de comparaison entre les poulains sains et malades d'un même haras. D'après les résultats de notre étude, nous constatons qu'il existe une différence de 27 jours entre la date de naissance moyenne du groupe des poulains sains et celui des poulains malades. Pourtant, cette différence n'est pas qualifiée de significative par le test de Mann-Whitney. Ceci est sans doute dû à la taille réduite de notre échantillon.

3.5.2 Analyse des données provenant des prélèvements de fèces

Au cours de la campagne de prélèvements, nous avons pu prélever une fois les crottins frais de chaque jument et chaque poulain. Les résultats complets sont disponibles en annexes dans des tableaux présentant les concentrations en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents pour chaque poulain et chaque jument des deux haras à la date de prélèvement indiquée.

Il apparaît que nous n'avons pas mis en évidence *Rhodococcus equi* dans les crottins collectés dans le haras H1. En revanche, dans le haras H2, les prélèvements de crottins ont révélé que 4 juments et 7 poulains étaient porteurs de *Rhodococcus equi* sur 42 chevaux. Cela signifie que 26,2 % de l'effectif du haras H2 est porteur de *Rhodococcus equi*, virulent ou non, dans le haras H2. Les figures présentent la répartition du portage de *Rhodococcus equi* au sein des juments suivies et de leurs poulains dans le haras H2.

Figure n° 10: Répartition du portage de *Rhodococcus equi* chez les 21 juments suivées du haras H2

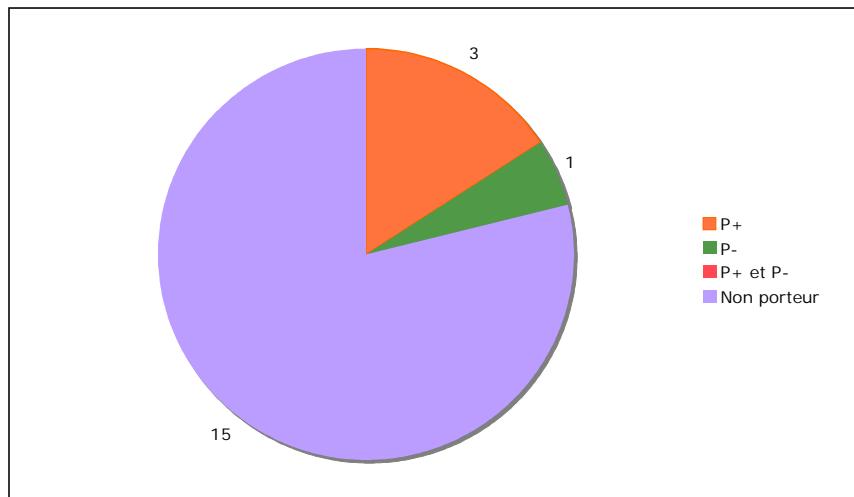
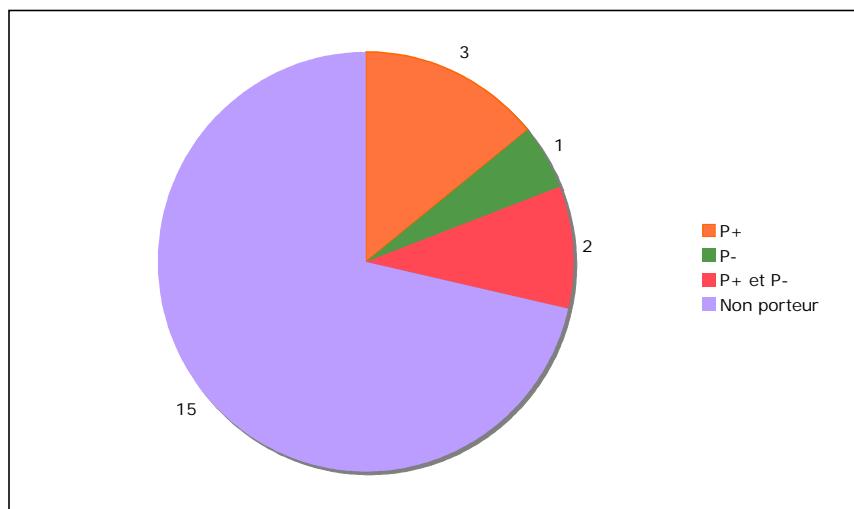


Figure n° 11: Répartition du portage de *Rhodococcus equi* chez les 21 poulains du haras H2



Nous avons comparé le portage de *Rhodococcus equi* entre les deux haras. Ainsi, nous avons tout d'abord étudié le portage de *Rhodococcus equi*, virulent ou non virulent, entre les deux haras. Ainsi, 0 chevaux sur 32 sont porteurs dans le haras H1. Pour le haras H2, 11 chevaux sur 42 (4 juments et 7 poulains) sont dénombrés porteurs de *Rhodococcus equi*. Le *Test exact de Fisher* montre qu'il existe une différence significative en ce qui concerne le portage de *Rhodococcus equi* entre les haras H1 et H2 (p bilatéral < 0.0017).

Ensuite nous avons comparé le portage de *Rhodococcus equi* virulent entre les deux haras en utilisant de nouveau le *test exact de Fisher*. Dans le haras H1, aucun cheval sur 32 n'est porteur de *Rhodococcus equi* virulent alors que 9 chevaux sur 42 sont porteurs (3 juments et 6 poulains). Ce résultat montre qu'il existe une différence significative en ce qui concerne le portage de *Rhodococcus equi* virulent entre les haras H1 et H2 (p bilatéral < 0.0083).

Dans notre étude, le portage de *Rhodococcus equi* dans les crottins apparaît donc comme un paramètre discriminant entre le haras sain (H1) et le haras contaminé (H2). Bien sûr, ces résultats ne concernent que 2 haras et ne sont pas extrapolables. Cependant, dans la littérature, il est plutôt admis que la plupart des chevaux peuvent être porteurs de *Rhodococcus equi* et ce portage n'apparaît pas comme un moyen de différencier les haras malades des haras sains même s'il est admis que l'excrétion fécale (notamment par les poulains de moins de 8 semaines) de *R. equi* joue un rôle important dans la contamination du sol. (Prescott *et al.*, 1984; Takaï *et al.*, 1997; Takaï *et al.*, 1986). Il serait ainsi sans doute intéressant de comparer le portage de *R. equi* chez les chevaux d'un plus grand nombre de haras.

En outre, il est également intéressant de comparer le portage de *Rhodococcus equi* entre les poulains sains et les poulains atteints de rhodococcose. Ces analyses ont donc été menées sur l'effectif de poulains du haras H2, d'abord pour le portage de *Rhodococcus equi*, virulent ou non (tableau n° 25), puis pour celui de *Rhodococcus equi* virulent uniquement (tableau n° 26).

Tableau n° 25: Nombre d'individus porteurs de Rhodococcus equi, virulent ou non virulent, au sein des classes de poulains sains et malades

	Poulains sains	Poulains malades
Effectif	16	5
Porteur <i>R.equi</i> (P+ ou P-)	6	1
Non Porteur <i>R.equi</i>	10	4

Le test exact de Fisher met en évidence qu'il n'y a aucun lien entre le statut du poulain vis-à-vis de la rhodococcose et le portage de *Rhodococcus equi* (p bilatéral < 0,62).

Tableau n° 26: Nombre d'individus porteurs de Rhodococcus equi virulent au sein des classes de poulains sains et malades

	Poulains sains	Poulains malades
Effectif	16	5
Porteur <i>R.equi</i> P+	5	1
Non Porteur <i>R.equi</i> P+	11	4

Le test exact de Fisher met en évidence qu'il n'y a aucun lien entre le statut du poulain vis-à-vis de la rhodococcose et le portage de *Rhodococcus equi* virulent (p bilatéral < 1).

Nous nous devons de rester prudents quant à l'interprétation de ces résultats. En effet, ces prélèvements de fèces ne sont réalisés qu'une seule fois pour chaque individu au cours de la campagne de prélèvements et il est possible que la date du prélèvement des fèces soit parfois éloignée de celle du diagnostic. Ainsi, nous constatons que pour deux des poulains atteints de rhodococcose, les crottins ont été analysés avant la date de diagnostic par le vétérinaire (tableau n° 27). Pour autant, ces poulains pouvaient être déjà atteints à la date de prélèvements de fèces. Cet élément constitue une incertitude et donc une limite à la validité de l'interprétation tout comme la taille réduite de l'effectif.

Tableau n° 27: Dates du diagnostic de rhodococcose et dates des prélèvements de fèces chez les poulains atteints. Pour les poulains H2-P13 et H2-P19, le diagnostic de rhodococcose a été établi après la date de prélèvement des fèces

Code	Date du diagnostic	Date du prélèvement de fèces	Concentration en <i>Rhodococcus equi</i> (UFC/g)
H2-P2	02/05/2011	19/05/2011	0
H2-P11	09/06/2011	17/06/2011	0
H2-P13	28/05/2011	06/05/2011	6400 P+ et 1600 P-
H2-P19	04/07/2011	17/06/2011	0
H2-P20	19/04/2011	19/05/2011	0

Nous avons également étudié les relations entre le portage de *Rhodococcus equi*, virulent ou total, des juments pour les couples de jument-poulain « H2-J_{xi} – H2-P_{xi} » et les classes de poulains sains et malades.

*Tableau n° 28: Nombre d'individus porteur de *Rhodococcus equi*, virulent ou total, chez juments mères des poulains sains ou malades*

	Poulains sains	Poulains malades
Effectif	16	5
Mère porteuse de P+	3	0
Mère porteuse de P+ ou P-	4	0

D'après le tableau n° 28, nous constatons que les 5 poulains atteints de rhodococcose ont tous une mère non porteuse de *Rhodococcus equi* (donc a fortiori de *Rhodococcus equi* virulent). Cependant, étant donnés nos faibles effectifs, cette observation n'est pas

statistiquement significative (test exact de Fisher). Les résultats d'une étude menée sur 171 couples jument-poulain d'un même élevage montrent que les concentrations fécales en *Rhodococcus equi* total ou virulent ne sont pas significativement différentes chez les juments dont le poulain a été affecté par la rhodococcose (Grimm *et al.*, 2007). Cependant, puisque *Rhodococcus equi* a été détecté chez toutes les juments au moins une fois, cette étude conclue que l'excrétion fécale de *Rhodococcus equi* par les juments représente une source de contamination importante pour les poulains. Nous pouvons penser que le ramassage régulier des crottins réduit l'importance de cette source de contamination. Les crottins du haras H1 sont ramassés hebdomadairement alors qu'il n'y a pas de ramassage dans le haras H2.

En conclusion, nous constatons qu'il y a davantage de porteurs de *Rhodococcus equi* dans le haras atteint. De plus, il ne semble pas y avoir de lien entre le portage de *Rhodococcus equi* par les poulains et leurs statuts vis-à-vis de la rhodococcose. Enfin, nous avons constaté que les poulains atteints de rhodococcose n'avaient pas de mères porteuses de *Rhodococcus equi*. Cependant, nous pensons que le nombre d'individus dans notre étude reste insuffisant pour pouvoir conclure.

3.5.3 Analyse des données provenant des prélèvements de terre

3.5.3.1 Comparaison entre les deux haras

Avant tout, force est de constater que nous avons mis en évidence la présence de *Rhodococcus equi* virulent dans le sol du haras H1. Cela signifie que dans un haras réputé non contaminé, des souches virulentes de *Rhodococcus equi* sont présentes et donc que l'exposition des poulains à *Rhodococcus equi* virulent existe. Nous sommes intéressés en premier lieu à la comparaison entre les deux haras.

La figure n° 12 présente le nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi*, virulent ou non virulent, a été isolé selon chaque haras, et ce pour toutes les dates, surfaces, endroits et profondeurs cumulées. Le nombre de prélèvements de terre total réalisés au cours de la campagne pour chaque haras est de 144 (tableau n° 29).

Figure n° 12: Nombre de fois où *Rhodococcus equi* virulent et non virulent a été isolé selon chaque haras. Les souches virulentes sont représentées en rouge.

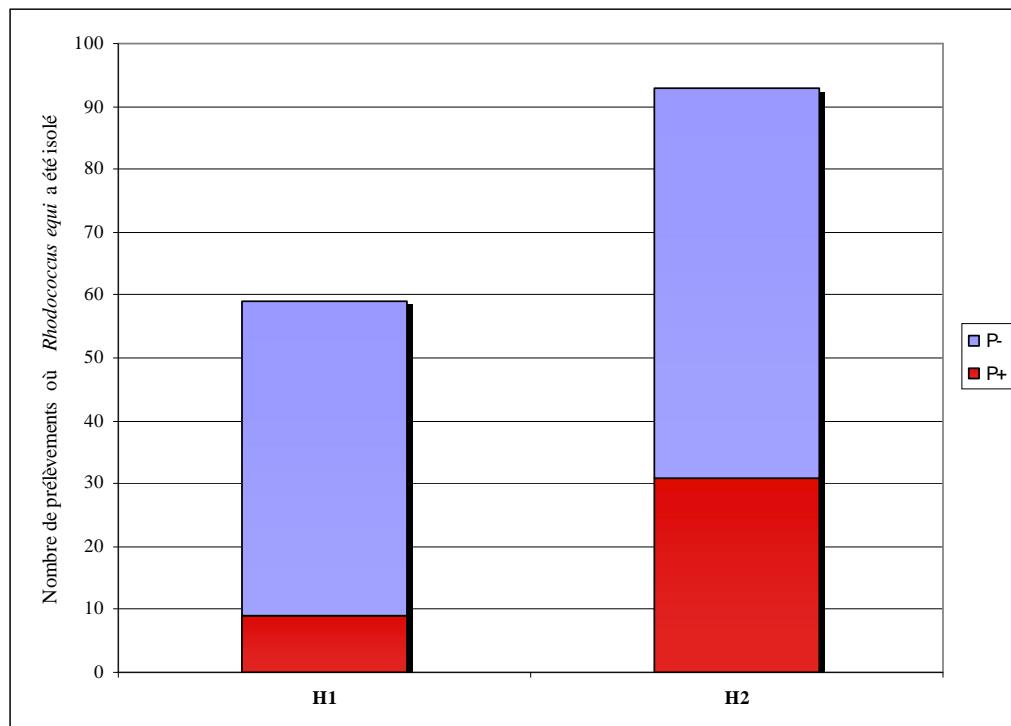


Tableau n° 29: Nombre de fois où *Rhodococcus equi* virulent ($P+$) et non virulent ($P-$) a été isolé selon chaque haras.

	<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>Total</i>
<i>P+</i>	9	31	40
<i>P-</i>	50	62	112
<i>Total</i>	59	93	141

Nous avons étudié la validité de l'hypothèse H0 : «Il n'y a pas de lien entre le type de haras et la présence de *Rhodococcus equi* dans la terre ». Le tableau n° 30 présente le tableau de contingence utilisé pour le test du χ^2 . Puisque les critères étudiés sont la présence ou l'absence de *Rhodococcus equi*, il est à noter que nous avons retranché les doublons par rapport aux effectifs du tableau n° 28. C'est à dire que les prélèvements pour lesquels *Rhodococcus equi* virulent ($P+$) et non virulent ($P-$) ont été isolés ne comptent désormais que pour un.

Tableau n° 30: Nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi* a été isolé ou non selon chaque haras

	H1	H2	Total
Présence R.equi	55	77	132
Absence R.equi	89	67	157
Total	144	144	288

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 6,769$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat nous permet de rejeter l'hypothèse H0 avec $p < 0,0093$. En conclusion, *Rhodococcus equi* est plus fréquemment isolé dans le sol du haras H2 que celui du haras H1 ($p < 0,01$).

Nous avons également étudié la validité de l'hypothèse H0 : «Il n'y a pas de liaison entre le type de haras et la présence de *Rhodococcus equi* virulent dans la terre ». Le tableau n° 31 est le tableau de contingence utilisé pour le test du χ^2 .

Tableau n° 31: Nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi* virulent a été isolé ou non selon chaque haras

	H1	H2	Total
Présence de P+	9	31	40
Absence de P+	135	113	248
Total	144	144	288

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 14,05$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat nous permet de rejeter l'hypothèse H0 avec $p < 0,00018$. En conclusion, *Rhodococcus equi* virulent est donc plus fréquemment isolé dans le sol du haras H2 que celui du haras H1 ($p < 0,001$).

En outre, il nous a paru intéressant de présenter la situation en termes de concentrations en *Rhodococcus equi* mesurées dans la terre (UFC/g de terre). Ces valeurs mesurées restent à relativiser compte tenu des concentrations extrêmement élevées qui peuvent être mesurées pour un seul prélèvement de terre. La figure n° 13 et le tableau n° 32 présentent les concentrations en *Rhodococcus equi*, virulent et non virulent, selon chaque haras et ce pour toutes les dates, surfaces, endroits et profondeurs cumulées.

Figure n° 13: Concentrations cumulées en *Rhodococcus equi*, virulent et non virulent, selon chaque haras

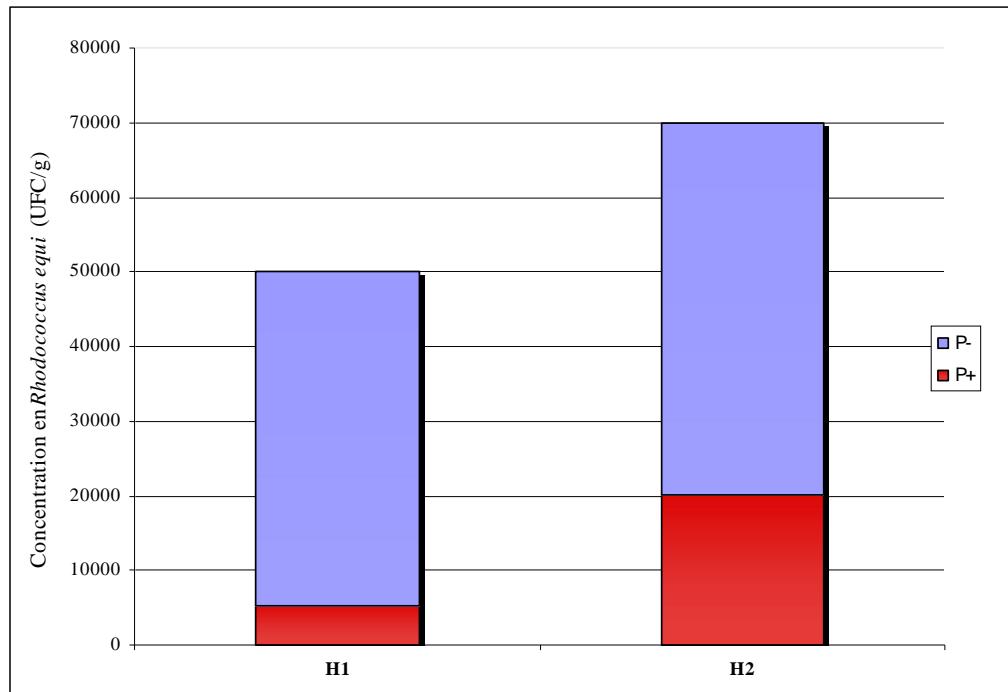


Tableau n° 32: Concentrations cumulées en *Rhodococcus equi*, virulent et non virulent, selon chaque haras

(UFC/g terre)	H1	H2	Total
P+	5 200	20 000	25 200
P-	44 800	50 000	94 800
Total	50 000	70 000	120 000

Nous constatons que, pour un nombre de prélèvements égal dans des surfaces semblables, les concentrations en *Rhodococcus equi* virulent et non virulents sont plus importantes dans le haras H2. Ainsi, si les concentrations en *Rhodococcus equi* non virulents sont proches (44 800 UFC/g de terre pour H1 et 50 000 UFC/g de terre pour H2), les concentrations en *Rhodococcus equi* virulents apparaissent nettement plus importantes pour le haras H2 (5 200 UFC/g de terre pour H1 et 20 000 UFC/g de terre pour H2). Compte tenu du nombre total de prélèvements, nous avons calculé les concentrations moyennes présentées au tableau n° 33.

Tableau n° 33: Concentration moyenne par prélèvement en *Rhodococcus equi*, virulent et non virulent, selon chaque haras

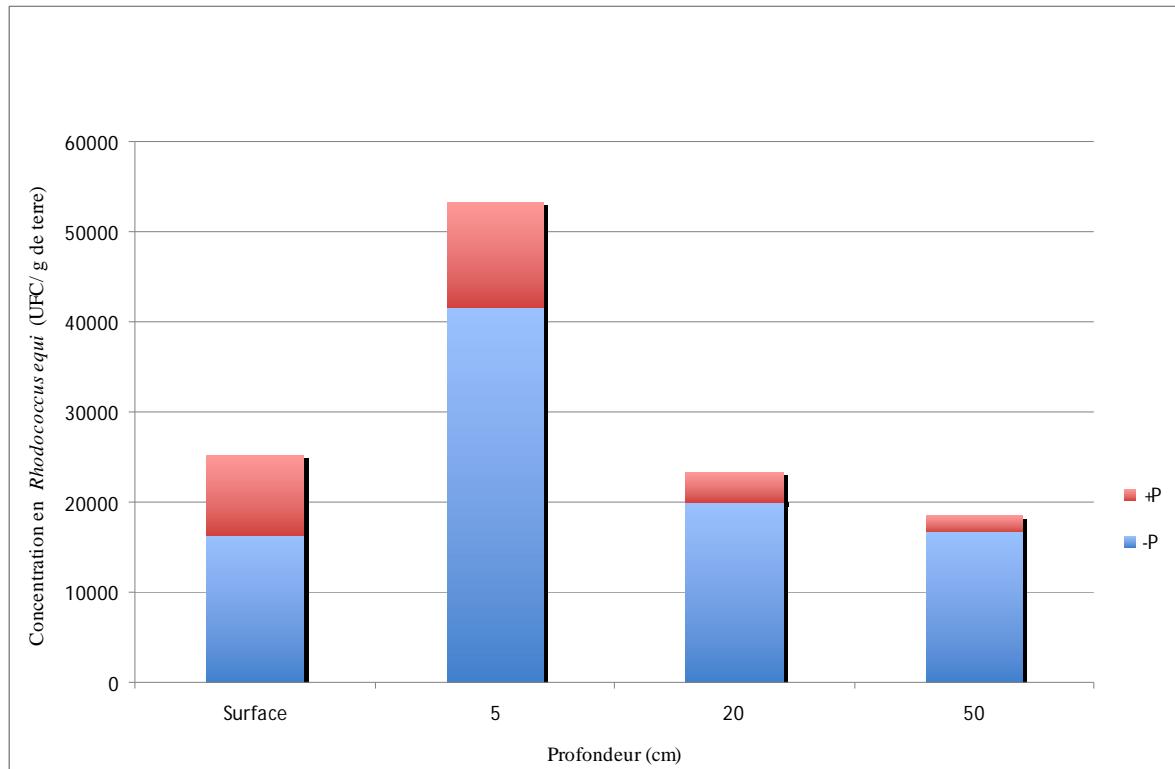
(UFC/g terre)	H1	H2	Total
P+	36,11	138,89	175
P-	311,11	347,22	658,33
Total	347,22	486,11	833,33

L'utilisation du test de Wilcoxon nous a permis de comparer les concentrations médianes. Ainsi, *Rhodococcus equi*, virulent ou non, est présent en concentrations plus importantes dans le haras H2 ($p<0,0044$). De même, *Rhodococcus equi* virulent est présent en concentrations plus importantes dans le haras H2 ($p<0,004$). En conclusion, nous pouvons avancer qu'il y a davantage de *Rhodococcus equi*, virulent ou non, tout comme davantage de *Rhodococcus equi* virulent dans le haras H2, c'est-à-dire dans le haras contaminé. Selon la littérature (Martens et al., 2002a; Martens et al., 2000), *Rhodococcus equi* virulent a été isolé dans les élevages qu'ils soient sains ou contaminés. Une de ces études a d'ailleurs conclu que les concentrations en *Rhodococcus equi* virulent ne sont pas significativement différentes entre les élevages indemnes et contaminés (Martens et al., 2000). Nos résultats obtenus dans 2 haras avec un très grand nombre de prélèvements tendent de la même manière à montrer que *Rhodococcus equi* virulent ou non est présent dans le sol quel que soit le statut sanitaire du haras. En revanche, la contamination du sol est significativement plus élevée dans le haras présentant des épisodes récurrents de rhodococcose (H2) par rapport au haras sain (H1). Ce résultat diffère des études antérieures (Cohen, 2008; Martens, 2000) mais il est difficile de comparer nos résultats à ceux de ces études puisque notre protocole de prélèvements est différent des leurs (notamment par la réalisation de prélèvements à 4 profondeurs différentes). Il serait nécessaire de réaliser des prélèvements dans un plus grand nombre d'élevages pour confirmer ou infirmer l'existence d'une différence entre haras indemnes et haras atteints.

3.5.3.2 Comparaison selon la profondeur du prélèvement

Dans un second temps, nous avons analysé les concentrations en *Rhodococcus equi* selon la profondeur du prélèvement. Pour rappel, les prélèvements de terre ont été réalisés en surface, à 5, 20 et 50 centimètres de profondeur. La figure n° 14 présente ces concentrations cumulées pour les 6 séances, les surfaces et pour les deux haras.

Figure n° 14: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents (UFC/g) selon la profondeur. Données cumulées pour les deux haras.



Au vu de la figure n° 14, il apparaît qu'il existe un pic de concentration en *Rhodococcus equi* à la profondeur de 5 centimètres. En effet, cette profondeur concentre à elle seule 44,79 % des colonies de *Rhodococcus equi* mis en évidence. De plus, il est important de noter que *Rhodococcus equi* virulent est présent à 50 centimètres de profondeur dans le sol, ce qui ne va pas sans soulever certains problèmes concernant une éventuelle éradication des *Rhodococcus equi* virulents. Nous avons étudié la répartition des prélèvements où *Rhodococcus equi* a été isolé selon deux classes de profondeur (tableau n° 34). La première, superficielle, concerne les prélèvements effectués en surface et à 5 cm de profondeur tandis que la seconde, profonde, intéresse les prélèvements réalisés à 20 et 50 cm de profondeur.

Tableau n° 34: Nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi*, virulent et non virulent, selon les niveaux de prélèvements superficiels (surface et 5 cm) et les niveaux de prélèvements profonds (20 cm et 50 cm). Un prélèvement contenant des *Rhodococcus equi* virulents et non virulents n'est comptabilisé qu'une seule fois

	<i>Superficiel</i>	<i>Profond</i>	<i>Total</i>
<i>Présence de R.equi</i>	76	55	131
<i>Absence de R.equi</i>	68	89	157
<i>Total</i>	144	144	288

Nous avons étudié la validité de l'hypothèse H0 : « *Rhodococcus equi* n'est pas davantage présent à une classe de profondeur donnée ». Le tableau de contingence utilisé pour le test d'indépendance du χ^2 est celui du tableau n° 33. Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 6,175$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat nous permet de rejeter l'hypothèse H0 avec $p < 0,0013$. En conclusion, *Rhodococcus equi* est davantage présent aux faibles profondeurs (surface et 5cm) qu'aux profondeurs plus importantes (20 et 50 cm).

Nous avons également étudié la validité de l'hypothèse H0 : « *Rhodococcus equi virulent* n'est pas davantage présent à une classe de profondeur donnée ». Le tableau de contingence avec lequel le test d'indépendance du χ^2 a été réalisé est présenté ci-dessous (tableau n° 35).

*Tableau n° 35: Nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi virulent* a été mis en évidence selon les niveaux de prélèvements superficiels (surface et 5 cm) et les niveaux de prélèvements profonds (20 cm et 50 cm)*

	<i>Superficiel</i>	<i>Profond</i>	<i>Total</i>
<i>Présence de P+</i>	30	10	40
<i>Absence de P+</i>	114	134	248
<i>Total</i>	144	144	288

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 11,61$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat nous permet de rejeter l'hypothèse H0 avec $p < 0,00065$. En conclusion, *Rhodococcus equi virulent* est plus fréquemment isolé aux faibles profondeurs (surface et 5 cm) qu'aux profondeurs plus importantes ($p < 0,001$). Enfin, l'utilisation de test de Wilcoxon permet d'affirmer que les concentrations en *Rhodococcus equi*, virulent ou non, sont plus importantes aux faibles profondeurs qu'aux profondeurs plus importantes ($p < 0,00018$), tout comme celles de *Rhodococcus equi virulent* ($p < 0,0012$).

En outre, le nombre de fois où prélèvements de *Rhodococcus equi* virulent ou non sont positifs à la fois en surface (surface et 5cm) et en profondeur (20 cm et 50 cm) est de 33. Le nombre de fois où ces prélèvements sont positifs en surface alors qu'ils sont négatifs en profondeur est de 15. En revanche, le nombre de fois où les prélèvements mettent en évidence *Rhodococcus equi*, virulent ou non, en profondeur alors qu'il est absent en surface est de 6. Ainsi, sur 26 localisations où *Rhodococcus equi virulent* a été isolé, seules 2 n'auraient pas été positives si nous avions réalisé que des prélèvements en surface (soit 7,7 % de faux négatifs). Ainsi, sur 54 localisations où *Rhodococcus equi*, virulent ou non, a été isolé, seules 6 n'auraient pas été positives si nous n'avions réalisé que des prélèvements en surface (soit 11,1 % de faux négatifs).

Le nombre de fois où les prélèvements mettent en évidence *Rhodococcus equi* virulent à la fois en surface et en profondeur est de 8. Le nombre de fois où les prélèvements mettent en évidence *Rhodococcus equi* virulent en surface alors qu'il est absent en profondeur est de 16. En revanche, le nombre de fois où *Rhodococcus equi* virulent est isolé en profondeur alors qu'il ne l'est pas en surface est de 2. Ainsi, sur 26 localisations où *Rhodococcus equi* virulent a été isolé, seules 2 n'auraient pas été positives si nous n'avions réalisé que des prélèvements en surface (soit 7,7 % de faux négatifs). En conclusion, dans le cadre d'une étude à plus grande échelle, nous pourrions ainsi envisager une réduction du protocole de prélèvements en se limitant à des prélèvements à des niveaux superficiels (surface et 5 cm) pour évaluer la présence de *Rhodococcus equi* dans le sol.

En conclusion, nous retenons que *Rhodococcus equi* virulent et *Rhodococcus equi* total se concentrent davantage à des niveaux superficiels qu'à des niveaux profonds. La possibilité d'aérosolisation de la terre située en surface ou à faible profondeur et la présence de la plupart des bactéries virulentes dans cette zone superficielle rendent particulièrement intéressant ce résultat.

3.5.3.3 Comparaison selon la surface

En outre nous avons établi une comparaison entre les différents types de surfaces. La figure n° 15 et le tableau n° 36 présentent la répartition des prélèvements où *Rhodococcus equi* a été isolé.

Figure n° 15: Nombre de fois où Rhodococcus equi virulents et non virulents ont été isolés selon la surface pour les deux haras

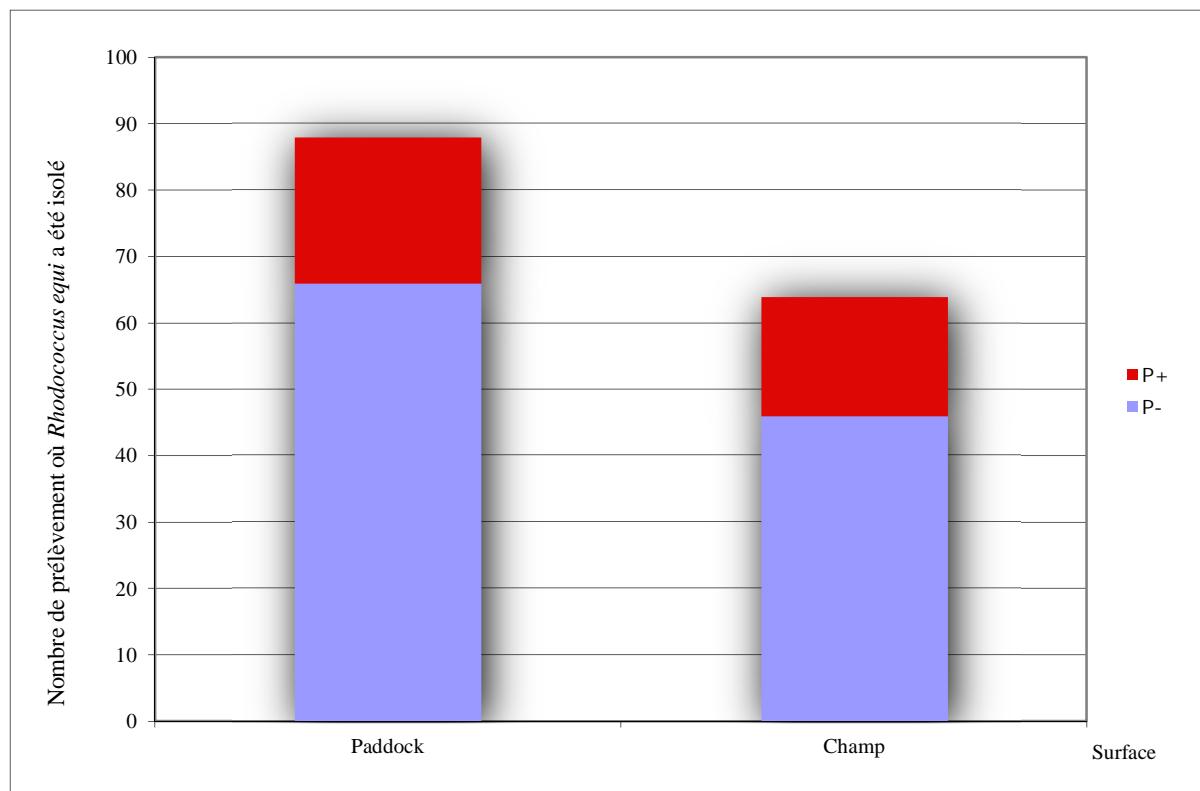


Tableau n° 36: Nombre de fois où *Rhodococcus equi* virulents et non virulents ont été isolés selon la surface pour les deux haras. Données chiffrées.

	Paddock	Champ
P+	22	18
P-	66	46

Nous avons vérifié la validité de l'hypothèse H0 : « *Rhodococcus equi* est retrouvé au paddock et au champ dans des proportions identiques ». Les effectifs sont présentés au tableau n° 37.

Tableau n° 37: Nombre de prélèvements mettant en évidence *Rhodococcus equi*, virulent ou non, selon chaque surface. Les données des deux haras sont cumulées.

	Paddock	Champ	Total
Présence de <i>R.equi</i>	62	59	121
Absence de <i>R.equi</i>	82	85	167
Total	144	144	288

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 0,128$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse H0. Nous avons également vérifié la validité de l'hypothèse H0 : « *Rhodococcus equi* virulent est retrouvé au paddock et au champ de manière identique ». Les effectifs sont présentés au tableau n° 38.

Tableau n° 38: Nombre de prélèvements mettant en évidence *Rhodococcus equi* virulent selon chaque surface. Les données des deux haras sont cumulées.

	Paddock	Champ	Total
Présence de P+	22	18	40
Absence de P+	122	126	248
Total	144	144	288

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 0,465$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse H0. Ainsi, d'après les résultats cumulés dans les deux haras, *Rhodococcus equi* total ou *Rhodococcus equi* virulent sont isolés avec la même fréquence dans les deux types de surface (paddock et champ).

Nous pouvons désormais étudier ces deux hypothèses pour chaque haras afin de vérifier si cette tendance est identique dans chacun d'entre eux. Le tableau n° 39 décrit les résultats obtenus dans le haras H1.

Tableau n° 39: Nombre de prélèvements mettant en évidence *Rhodococcus equi*, virulent ou non, selon chaque surface pour le haras H1

H1	Paddock	Champ	Total
Présence de <i>R.equi</i>	29	30	59
Absence de <i>R.equi</i>	43	42	85
Total	72	72	144

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 0,0287$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse H0. Nous étudions la même hypothèse avec *Rhodococcus equi* virulent (tableau n° 40).

Tableau n° 40: Nombre de prélèvements mettant en évidence *Rhodococcus equi* virulent selon chaque surface.

H1	Paddock	Champ	Total
Présence de <i>P+</i>	6	3	9
Absence de <i>P+</i>	66	69	135
Total	72	72	144

Compte tenu des effectifs réduits, nous avons utilisé le test exact de Fisher; la valeur obtenue est p bilatéral $< 0,49$. Ce résultat ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse. En conclusion, *Rhodococcus equi* virulent ou non, n'est pas plus fréquemment isolé dans le paddock que dans le champ du haras H1. À présent, étudions ces hypothèses pour le haras H2 (tableau n° 41).

Tableau n° 41: Nombre de prélèvements mettant en évidence *Rhodococcus equi*, virulent ou non, selon chaque surface pour le haras H2

H2	Paddock	Champ	Total
Présence de <i>R.equi</i>	59	33	92
Absence de <i>R.equi</i>	13	39	52
Total	72	72	144

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 20,35$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$ (avec $p < 0,00001$). Ce résultat nous permet de rejeter l'hypothèse H0. Cela signifie que *Rhodococcus equi* est plus fréquemment isolé dans le paddock que dans le champ du haras H2. Nous avons également vérifié la validité de l'hypothèse H0 : « *Rhodococcus equi* virulent est retrouvé au paddock et au champ de manière identique. » Les effectifs sont présentés au tableau n° 42.

Tableau n° 42: Nombre de prélèvements mettant en évidence *Rhodococcus equi* virulent selon chaque surface pour le haras H2

H2	Paddock	Champ	Total
Présence de P+	16	14	30
Absence de P+	56	58	114
Total	72	72	144

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 0,168$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse H0. En conclusion, *Rhodococcus equi* virulent, n'est pas plus fréquemment isolé dans le paddock que dans le champ du haras H2.

Pour les calculs suivants, nous n'avons pris en compte que les prélèvements isolant *Rhodococcus equi* virulent et réalisés en surface et à 5 cm de profondeur (tableau n° 43). En effet, la présence de *Rhodococcus equi* virulent en surface est celle la plus à même de jouer un rôle déterminant dans l'exposition aux poulains.

Tableau n° 43: Nombre de prélèvements en surface et à 5 cm mettant en évidence *Rhodococcus equi* virulent selon chaque surface pour le haras H1

H1	Paddock	Champ	Total
Présence de P+	4	3	7
Absence de P+	32	33	65
Total	36	36	72

Les résultats du test exact de Fisher ne nous permettent pas de rejeter l'hypothèse H0 au risque de $p < 0,05$. En conclusion, *Rhodococcus equi* virulent, n'est pas plus fréquemment isolé en surface dans le paddock que dans le champ du haras H1. Étudions à présent cette hypothèse dans le haras H2 (tableau n° 44).

Tableau n° 44: Nombre de prélèvements en surface et à 5 cm mettant en évidence *Rhodococcus equi* virulent selon chaque surface pour le haras H2

H2	Paddock	Champ	Total
Présence de P+	13	10	23
Absence de P+	23	26	49
Total	36	36	72

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 0,575$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$. Ce résultat ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse H0. En conclusion, *Rhodococcus equi* virulent, n'est pas plus fréquemment isolé en surface dans le paddock que dans le champ du haras H2.

L'étude des liens entre la fréquence à laquelle est retrouvée *Rhodococcus equi* et le type de surface ne permet pas de mettre en évidence clairement une tendance, excepté que la bactérie est plus fréquemment retrouvée dans le paddock que dans le champ du haras H2. Cependant, la présence de plusieurs colonies dans un seul prélèvement n'est pas correctement prise en compte par cette distinction selon la présence ou l'absence de *Rhodococcus equi* dans un prélèvement. Par conséquent, le tableau n° 45 présente les concentrations moyennes de *Rhodococcus equi*, virulent ou non, selon chaque surface.

*Tableau n° 45: Concentrations moyennes en *Rhodococcus equi* virulent et non virulent dans le sol de chaque surface*

	Paddock	Champ
Concentration moyenne <i>P+</i>	105,56	69,44
Concentration moyenne <i>P-</i>	436,11	222,22

Aucune différence statistiquement significative n'a été identifiée en ce qui concerne la fréquence à laquelle *Rhodococcus equi* est isolé sur une surface au sein d'un même haras. En revanche, l'étude des concentrations moyennes suggère que *Rhodococcus equi* est davantage présent dans le paddock que le champ. Le test de Wilcoxon comparant les concentrations médianes n'a pas mis en évidence de différence significative de concentrations en *Rhodococcus equi* virulent entre le paddock et le champ ($p<0,35$) mais souligne une différence significative pour *Rhodococcus equi* virulent ou non ($p<0,0045$).

À titre indicatif et descriptif, les figures présentent les concentrations en *Rhodococcus equi* virulent ou non selon la surface pour chaque profondeur et pour chaque haras.

Figure n° 16: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents selon la profondeur pour chaque surface dans le haras H1

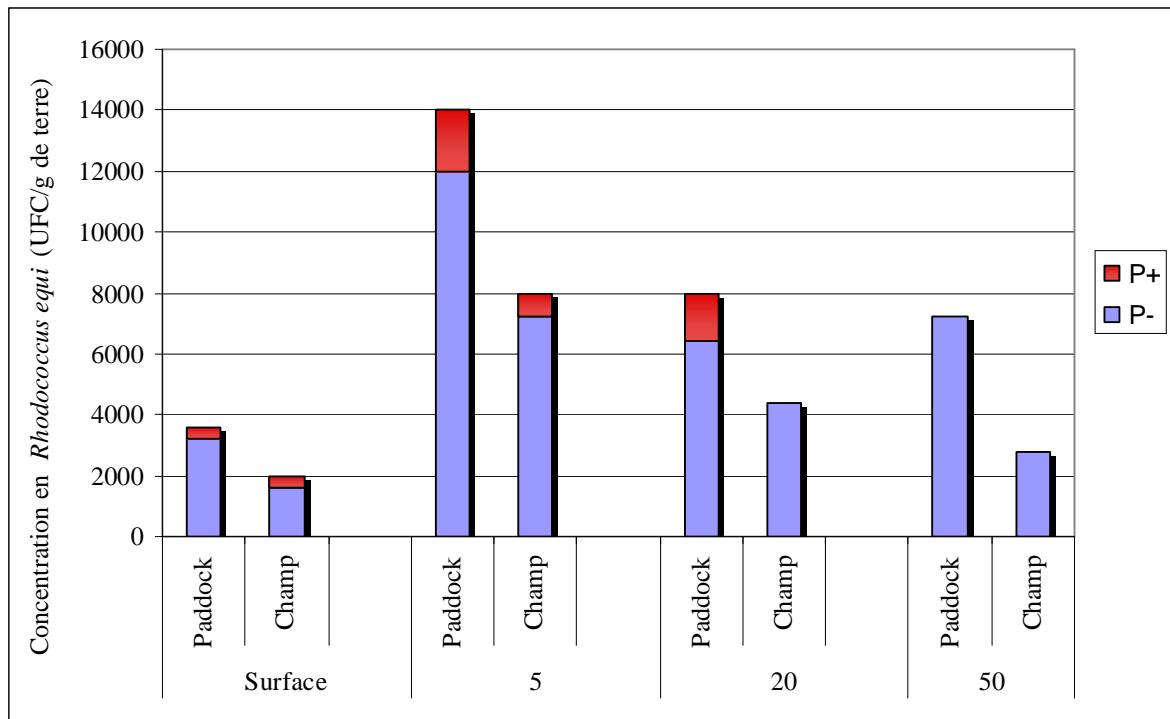
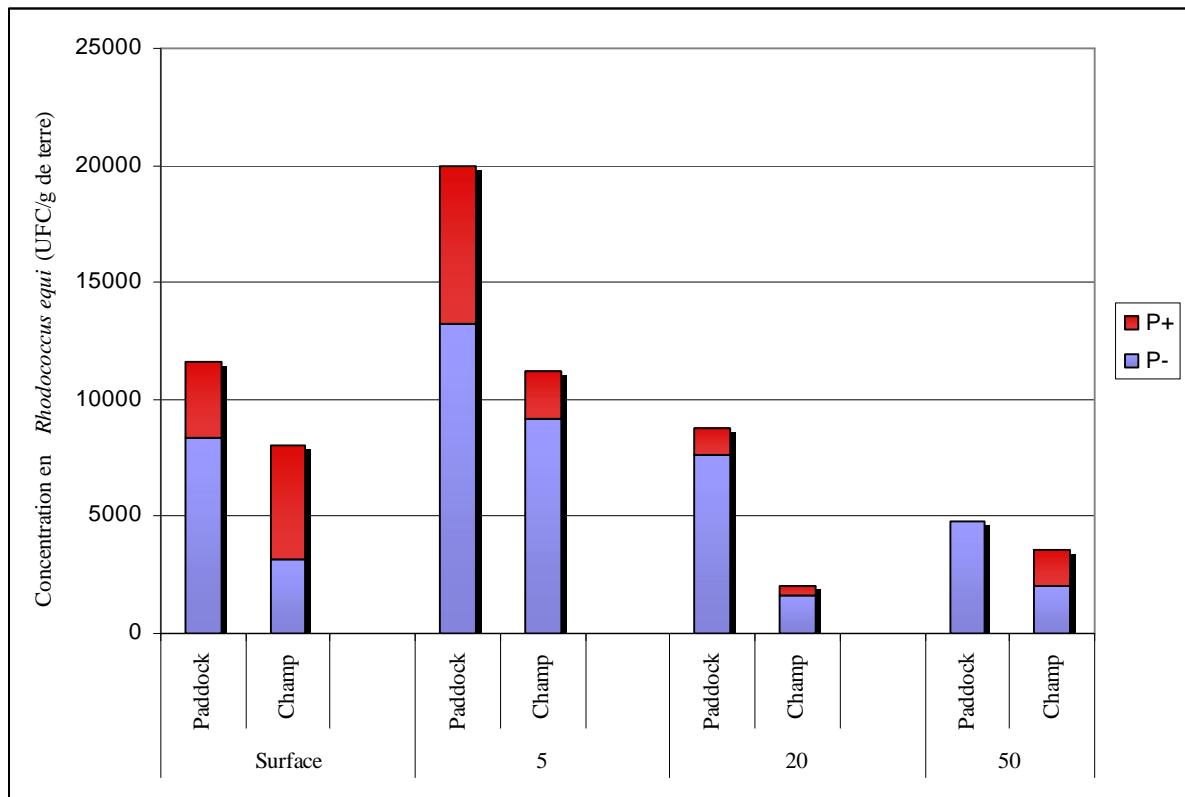


Figure n° 17: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents selon la profondeur pour chaque surface dans le haras H2



En comparant les figures nous visualisons que les concentrations en *Rhodococcus equi* sont plus élevées dans le haras H2 que le haras H1. Grâce à la distinction par surface, nous constatons également que les concentrations en *Rhodococcus equi* semblent être plus élevées dans les paddocks que dans les champs.

En conclusion, nos résultats montrent que la bactérie est isolée avec la même fréquence dans les 2 surfaces (paddock et champ) mais il semble qu'elle soit en concentration plus importante sur les paddocks.

3.5.3.4 Comparaison selon la localisation

Au sein de chaque surface, paddock ou champ, les prélèvements de terre ont été réalisés dans trois localisations différentes : l'entrée, le centre et l'auge. Pour rappel, la localisation « auge » désigne un espace qui, selon le lieu, présente une auge, une pierre à sels au sol ou bien un abreuvoir. Dans tous les cas, il s'agit d'un endroit très sollicité bien distinct de l'entrée. Les effectifs sont présentés au tableau n° 46.

*Tableau n° 46: Nombre de prélèvements isolant *Rhodococcus equi*, virulent ou non, selon les localisations au sein des deux surfaces. Les données sont cumulées pour les deux haras.*

	Auge	Centre	Entrée	Total
Présence de <i>R.equi</i>	36	44	74	154
Absence de <i>R.equi</i>	60	52	22	134
Total	96	96	96	288

Nous avons étudié la validité de l'hypothèse H0 : « *Rhodococcus equi* est isolé à la même fréquence quelle que soit la localisation sur une surface». Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 33,61$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 5,991$ ($p < 0,00001$). Ce résultat nous permet de rejeter l'hypothèse H0. En conclusion, *Rhodococcus equi* virulent ou non, est plus fréquemment isolé à l'entrée des surfaces. De même, nous avons étudié cette hypothèse pour *Rhodococcus equi* virulent (tableau n° 47).

*Tableau n° 47: : Nombre de prélèvements isolant *Rhodococcus equi* virulent selon les localisations au sein des deux surfaces. Les données sont cumulées pour les deux haras.*

	Auge	Centre	Entrée	Total
Présence de P+	4	12	24	40
Absence de P+	92	84	72	248
Total	96	96	96	288

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 17,65$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 5,991$ (avec $p < 0,00015$). Ce résultat nous permet de rejeter l'hypothèse H0. En conclusion, *Rhodococcus equi* virulent est plus fréquemment isolé à l'entrée des surfaces. Ainsi, l'entrée, que ce soit celle du champ ou du paddock, semble être une zone plus à risque d'exposition pour les poulains.

En outre, nous avons souhaité savoir s'il existe une localisation davantage à risque dans chaque surface pour chaque haras. Étant donné que nous sommes à la recherche d'une zone pouvant présenter un risque, nous avons choisi de ne prendre en compte que les prélèvements mettant en évidence *Rhodococcus equi* virulent et réalisés à de faibles profondeurs, c'est-à-dire en surface et à 5cm. Devant les faibles effectifs, les conditions d'application du test d'indépendance du χ^2 n'étaient pas remplies. Nous avons donc regroupés les effectifs observés dans les localisations auge et centre afin d'utiliser le test de Fisher (tableau n° 48).

*Tableau n° 48: Nombre de prélèvements isolant *Rhodococcus equi* virulent à une faible profondeur dans le paddock du haras H1 selon deux classes de localisation*

H1	Auge et Centre	Entrée	Total
Présence de P+	1	3	4
Absence de P+	23	9	32
Total	24	12	36

Le test de Fisher ne permet pas d'affirmer que *Rhodococcus equi* virulent est plus fréquemment isolé à l'entrée du paddock à faible profondeur dans le haras H1 (p bilatéral<0,098). Nous avons procédé de la même manière pour le champ (tableau n° 49).

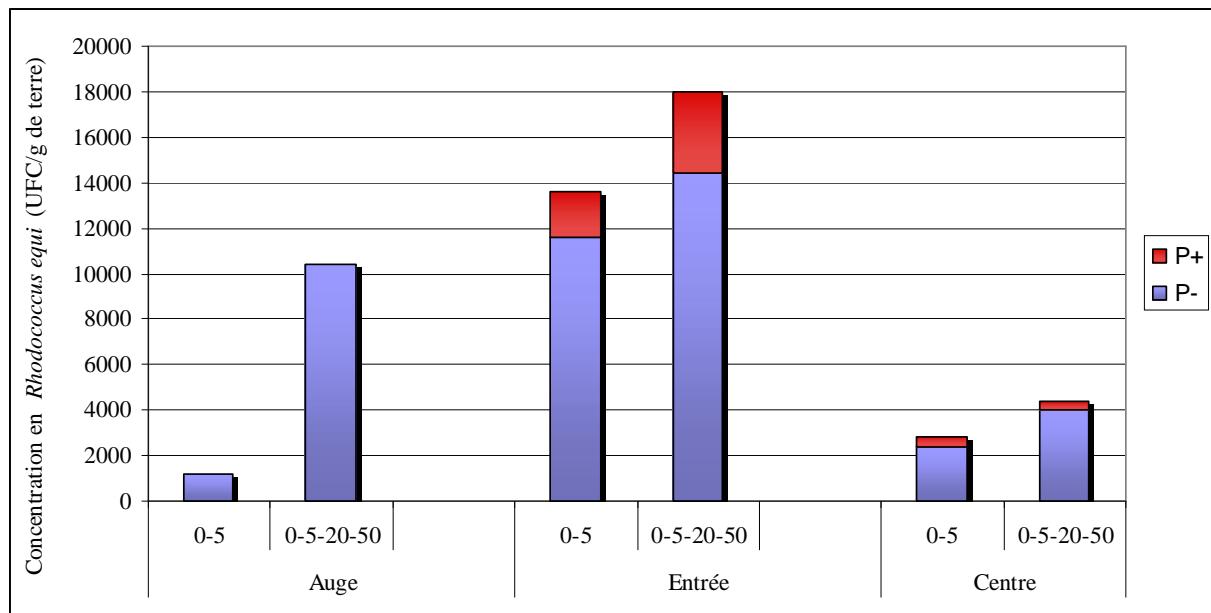
*Tableau n° 49: Nombre de prélèvements isolant *Rhodococcus equi* virulent à une faible profondeur dans le champ du haras H1 selon deux classes de localisation*

H1	Auge et Centre	Entrée	Total
Présence de P+	0	3	4
Absence de P+	24	9	32
Total	24	12	36

Le test de Ficher permet d'affirmer que *Rhodococcus equi* virulent est plus fréquemment isolé à l'entrée du champ à faible profondeur dans le haras H1 (p bilatéral<0,031).

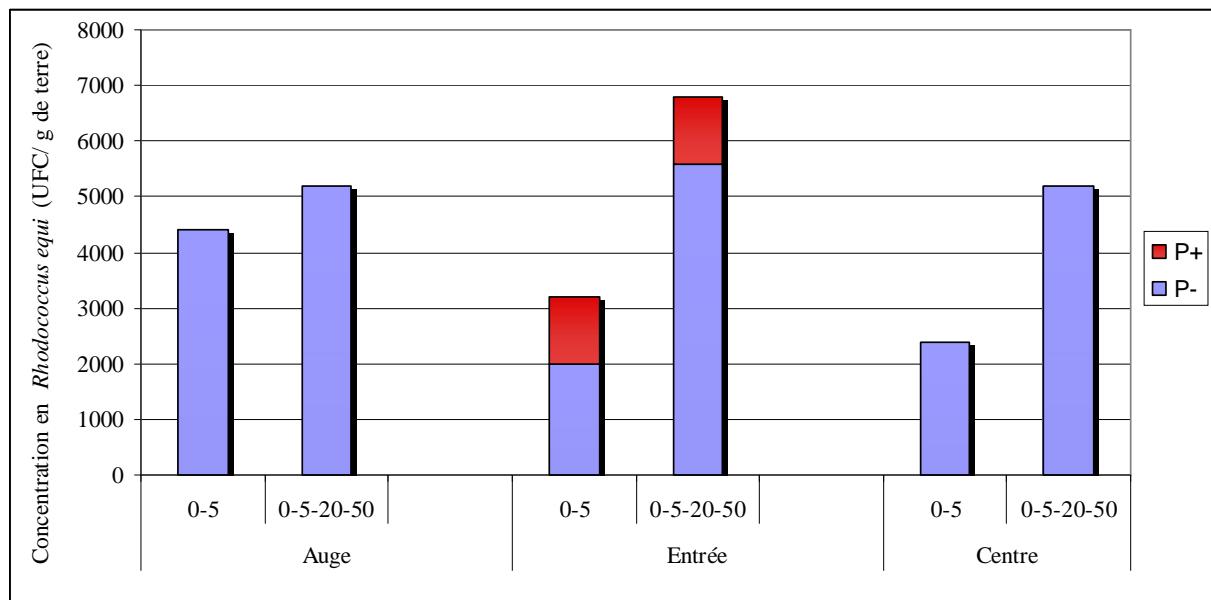
À titre indicatif les figures n° 18 et n° 19 présentent respectivement les concentrations en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans le paddock et le champ du haras H1.

Figure n° 18: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans le paddock du haras H1 selon la localisation du prélèvement (auge, entrée, centre) et sa profondeur.



D'après la figure n° 18, nous visualisons que *Rhodococcus equi* virulent est majoritairement présent à l'entrée du paddock. Nous n'avons mis en évidence qu'une seule fois *Rhodococcus equi* virulent au centre du paddock sur la totalité des prélèvements.

Figure n° 19: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans le champ du haras H1 selon la localisation du prélèvement (auge, entrée, centre) et sa profondeur.



D'après la figure n° 19, nous visualisons que *Rhodococcus equi* virulent est seulement présent à l'entrée du champ. En conclusion, nous retenons que *Rhodococcus equi* virulent se concentre essentiellement à l'entrée du champ et du paddock dans le haras H1. Nous

remarquons que *Rhodococcus equi* virulent n'a jamais été isolé au sein des prélèvements réalisés autour de l'auge. Pourtant, ce type de surface souffrant d'un manque d'enherbement a très souvent choisi comme site de prélèvement dans certaines études précédentes (Martens *et al.*, 2002a; Muscatello *et al.*, 2006).

De la même manière, nous avons recherché les localisations à risque dans le haras H2. De nouveau, nous avons donc regroupés les effectifs observés dans les localisations auge et centre afin d'utiliser le test de Fisher (tableau n° 50).

*Tableau n° 50: Nombre de prélèvements isolant *Rhodococcus equi* virulent à une faible profondeur dans le paddock du haras H2 selon deux classes de localisation*

H2	Auge et Centre	Entrée	Total
Présence de P+	8	5	13
Absence de P+	16	7	23
Total	24	12	36

Le test de Fisher ne permet pas d'affirmer que *Rhodococcus equi* virulent est plus fréquemment présent à une certaine localisation du champ à faible profondeur (p bilatéral <0,72). Nous avons procédé de la même manière pour le champ (tableau n° 51).

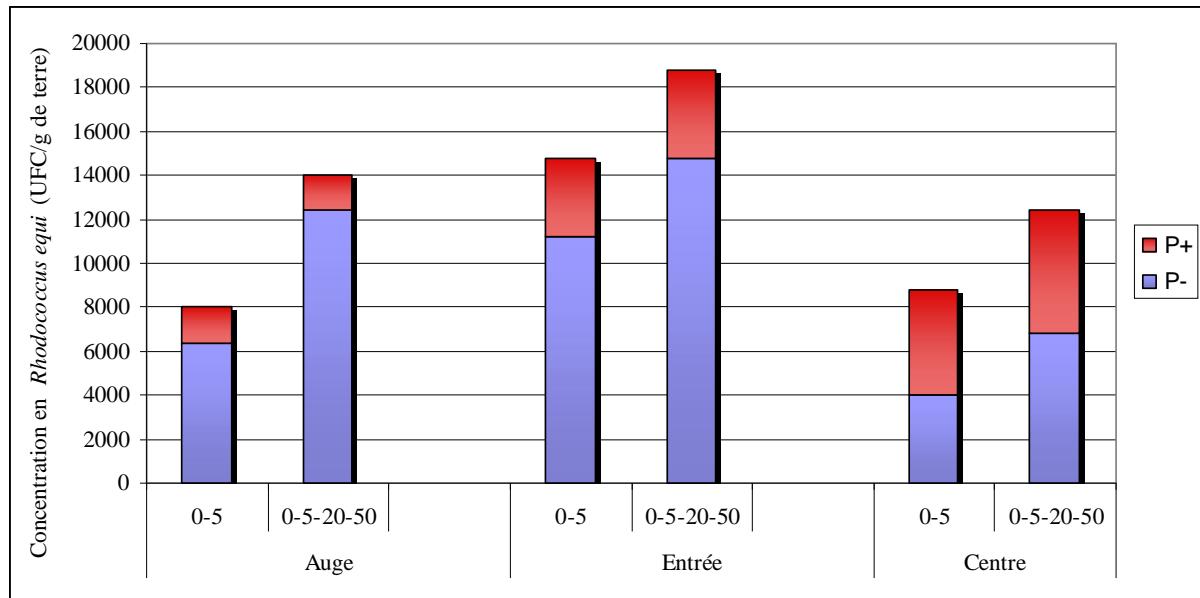
*Tableau n° 51: Nombre de prélèvements isolant *Rhodococcus equi* virulent à une faible profondeur dans le champ du haras H2 selon deux classes de localisation*

H2	Auge et Centre	Entrée	Total
Présence de P+	4	6	10
Absence de P-	20	6	27
Total	24	12	36

Le test de Fisher ne permet pas d'affirmer que *Rhodococcus equi* virulent est davantage isolé à une certaine localisation du champ à faible profondeur (p bilatéral <0,053).

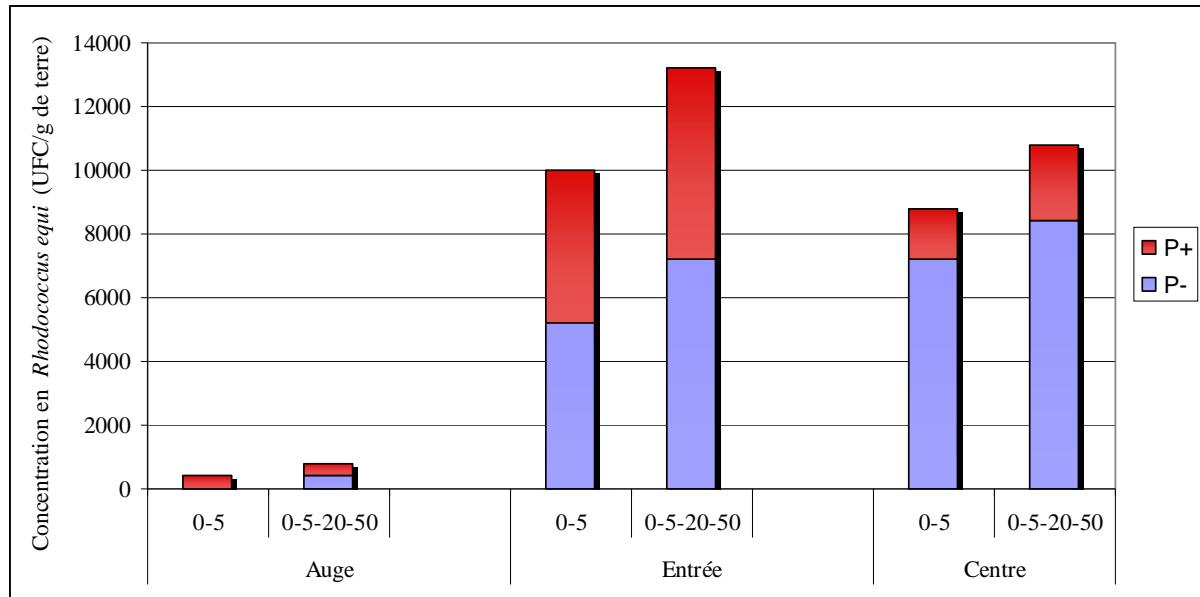
À titre indicatif, les figures présentent respectivement les concentrations en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans le paddock et le champ du haras H2.

Figure n° 20: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans le paddock du haras H2 selon la localisation du prélèvement (auge, entrée, centre) et sa profondeur



Les résultats du test de Fisher et la visualisation de la figure n° 20 montrent que *Rhodococcus equi* virulent est aussi fréquemment présent dans les 3 localisations étudiées dans le paddock du haras H2 et ce à des concentrations similaires.

Figure n° 21: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans le champ du haras H2 selon la localisation du prélèvement (auge, entrée, centre) et sa profondeur



Les résultats du test de Fisher montrent que *Rhodococcus equi* virulent est présent dans les 3 localisations étudiées dans le champ. Cependant, ce résultat est peut être dû à la réunion des localisations « auge » et « centre » en un seul groupe puisque la visualisation de la figure n° 21 montre que l'« entrée » semble être une localisation où la concentration en *Rhodococcus equi* virulent est la plus importante.

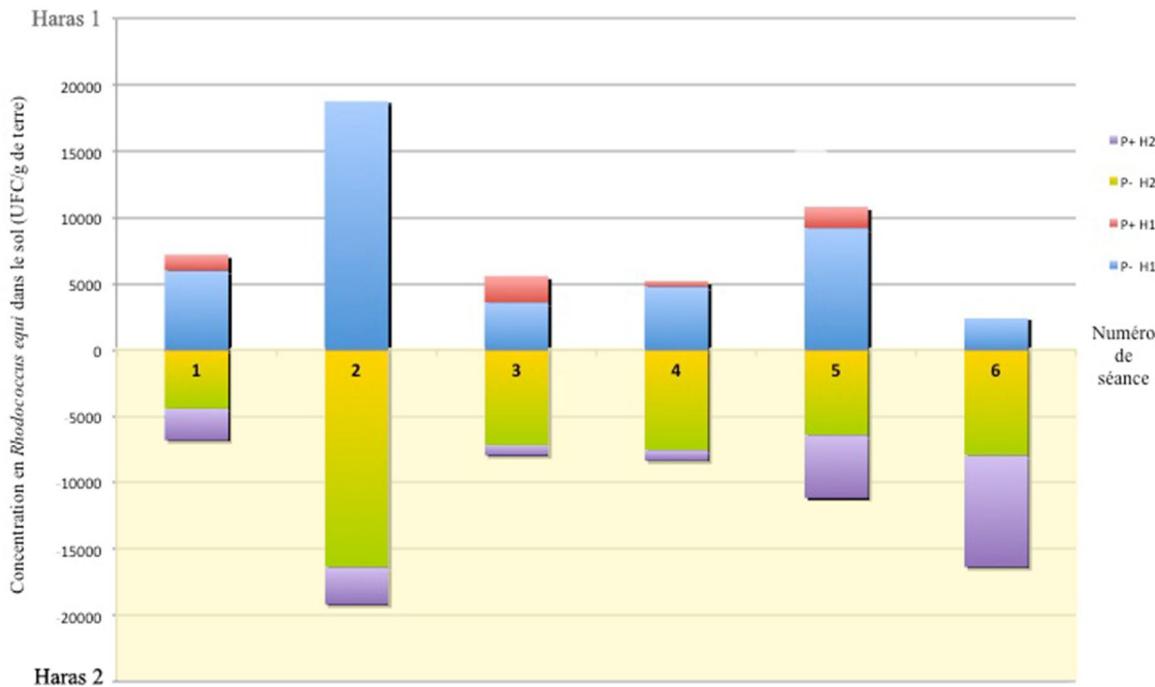
En conclusion, *Rhodococcus equi* virulent est plus fréquemment isolé à l'entrée des surfaces. (pour les 2 haras et les 2 surfaces confondus). L'entrée, que ce soit celle du champ ou du paddock, semble être une zone plus à risque d'exposition pour les poulains. Les résultats du haras H1 semblent confirmer ces résultats globaux : *Rhodococcus equi* virulent se concentre essentiellement à l'entrée du champ et du paddock dans le haras H1. Les résultats dans le haras H2 sont différents : *Rhodococcus equi* virulent n'est pas plus fréquemment isolé dans l'entrée du paddock ou du champ. Cependant, dans le champ du haras H1, l'entrée du champ semble tout de même être une localisation où la concentration en *Rhodococcus equi* virulent est la plus importante.

Par ailleurs, en comparaison avec les résultats obtenus pour le haras H1, le haras H2 présente une contamination plus diffuse dans les deux surfaces. De plus l'étude des figures ainsi que les résultats obtenus quant à la profondeur laissent à penser que *Rhodococcus equi* virulent est non seulement présent sur toute la surface mais aux faibles profondeurs de surcroît. Ainsi, dans l'hypothèse d'aérosolisation de la bactérie, les poulains évoluant sur ces surfaces seraient particulièrement exposés.

3.5.3.5 Comparaison selon le temps

Nous avons également étudié l'évolution des concentrations en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents au cours du temps. Sur la figure n° 22, nous avons représenté chaque séance de prélèvements par un numéro sur l'axe des abscisses. Sur l'axe des ordonnées sont représentées les concentrations en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents pour chaque haras avec H1 vers le haut, et H2 vers le bas. Cette disposition facilite la comparaison des concentrations au cours du temps.

Figure n° 22: Évolution des concentrations en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents en fonction du temps. Il y a 6 séances consécutives. Les valeurs des concentrations en *Rhodococcus equi* sont représentées au-dessus de l'axe horizontal central pour H1 et en-dessous de cet axe pour H2



D'après la figure n° 22, nous constatons qu'il existe une évolution quasiment symétrique des concentrations totales en *Rhodococcus equi* pour chaque séance entre les deux haras. Nous avons donc émis l'hypothèse que certains facteurs pourraient influencer la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol. Très peu de variables semblent influencer les concentrations en *Rhodococcus equi* virulent dans le sol (Muscattello *et al.*, 2006). Dans cette étude menée par Muscatello *et al.*, certains paramètres sont associés aux concentrations en *Rhodococcus equi* virulents tels que l'hygrométrie du sol, celle de l'air, la taille du groupe de poulains ou la date mais pour certaines surfaces seulement. Aucun paramètre étudié n'a permis d'expliquer les variations de concentrations observées. Nous pensons que les facteurs susceptibles d'influencer les concentrations en *Rhodococcus equi* dans le sol pourraient être la contamination par des porteurs, des facteurs climatiques (température, pluie) ou bien des facteurs liés au sol (pH, hygrométrie, concentration en oligo-éléments).

Compte tenu de l'espacement entre les séances de prélèvements qui est d'environ 15 jours, notre choix s'est porté sur un paramètre quantitatif cumulatif plutôt qu'un paramètre quantitatif ponctuel. Aussi nous avons souhaité étudier la corrélation entre la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol et la pluviométrie cumulée depuis la séance précédente. En effet, à l'issue de la seconde séance de prélèvements, nous avons constaté que les concentrations mesurées dans le sol avaient fortement augmenté après une période de faible pluviométrie. Les données utilisées sont celles des stations météo France situées à proximité de chaque haras. Nous avons étudié la corrélation entre la concentration en *Rhodococcus equi*

virulent ou non présent dans le sol et la quantité de précipitations cumulées en calculant le coefficient de corrélation de Spearman sur les 6 séances pour chaque haras. Les valeurs du coefficient de corrélation de Spearman obtenues pour l'étude de la relation entre concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et les précipitations cumulées entre chaque séance de prélèvement ne permettent pas de conclure à une corrélation (-0,754 pour H1 et -0,371 pour H2). Nous avons considéré que la relation est significative lorsque $|Valeur_{calculée}| > 0,89$, ce qui représente classiquement un seuil de risque d'erreur de 5%.

Il paraît difficile de corrélérer une concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol à un seul paramètre climatique.

De plus, ces concentrations sont amenées à évoluer de manière importante au cours de la saison de par la présence des juments suitées sur ces surfaces. En effet, certains chevaux sont porteurs de *Rhodococcus equi* au sein du haras H2. En outre la gestion du ramassage des crottins est différente entre les deux haras avec notamment un ramassage très fréquent dans le haras H1 d'où en théorie une absence d'influence de la présence de juments du haras H1 d'autant plus qu'aucun porteur de *Rhodococcus equi* n'a été identifié dans ce haras.

3.5.4 Analyse des données provenant des autres prélèvements réalisés au sol

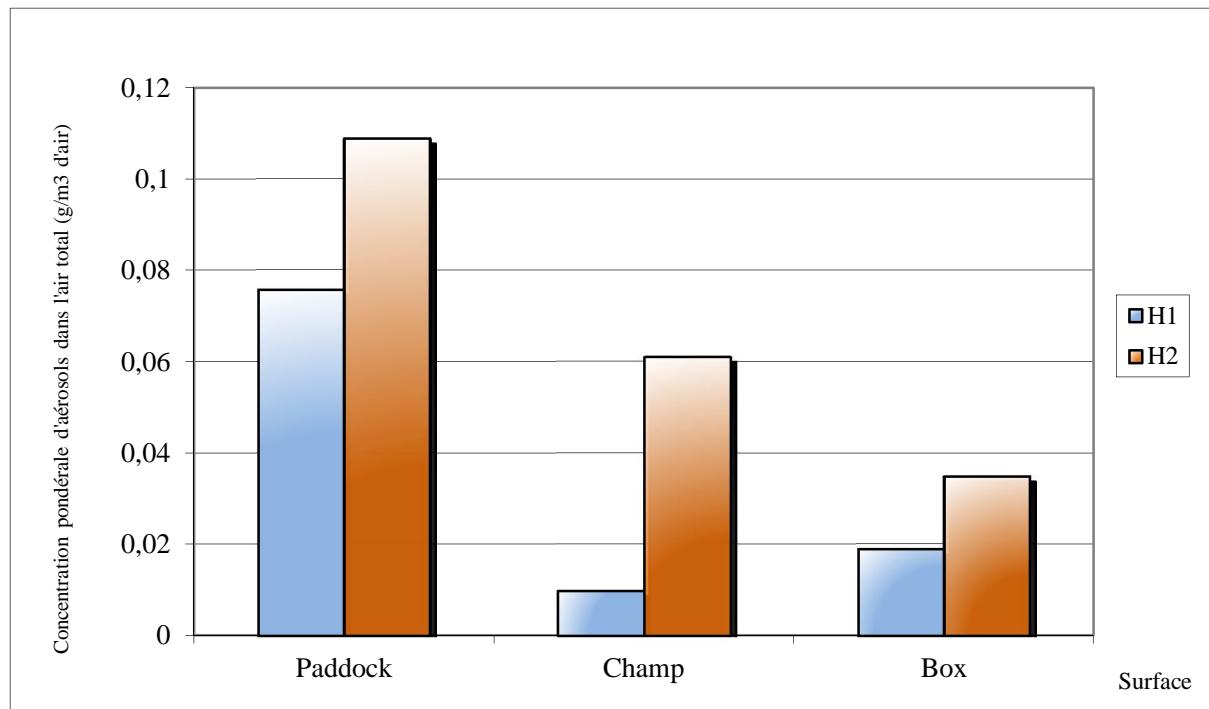
Nous avons également évalué la présence de *Rhodococcus equi* dans le haras, au sol du box ainsi que dans certains endroits stratégiques grâce aux lingettes. Ainsi dans les deux haras, pour chaque séance, nous avions appliqué une lingette au sol du box dans lequel nous réalisions les prélèvements d'air. Nous n'avons jamais isolé *Rhodococcus equi* au sol dans un box. Pourtant, au sein du haras H2, la moitié des prélèvements a été réalisée dans un box abritant une jument et son poulain tous deux porteurs de *Rhodococcus equi* virulents dans leurs crottins. Ce résultat est donc d'autant plus surprenant.

Pour ce qui est des autres prélèvements au sol, nous avions appliqué la lingette dans une allée fréquentée par les juments suitées dans chaque haras ainsi que devant le box de gynécologie du haras H2. Aucun *Rhodococcus equi* n'a été retrouvé dans les allées des haras. Cependant, nous avons isolé *Rhodococcus equi* par 2 fois sur 6 séances devant le box de gynécologie du haras H2. Un *Rhodococcus equi* virulent et un non virulent ont été isolés. Ce résultat est intéressant puisque, dans une étude épidémiologique récente (Tapprest *et al.*, 2012), la présence d'un local d'échographie au sein d'un haras et son utilisation partagée pour les juments résidentes et extérieures représentait un facteur de risque significatif. Enfin ces prélèvements réalisés au sol à l'aide de lingette ne permettent pas d'évaluer quantitativement la charge de *Rhodococcus equi* mais seulement sa présence ou son absence.

3.5.5 Analyse des données provenant des concentrations pondérales de poussières dans l'air

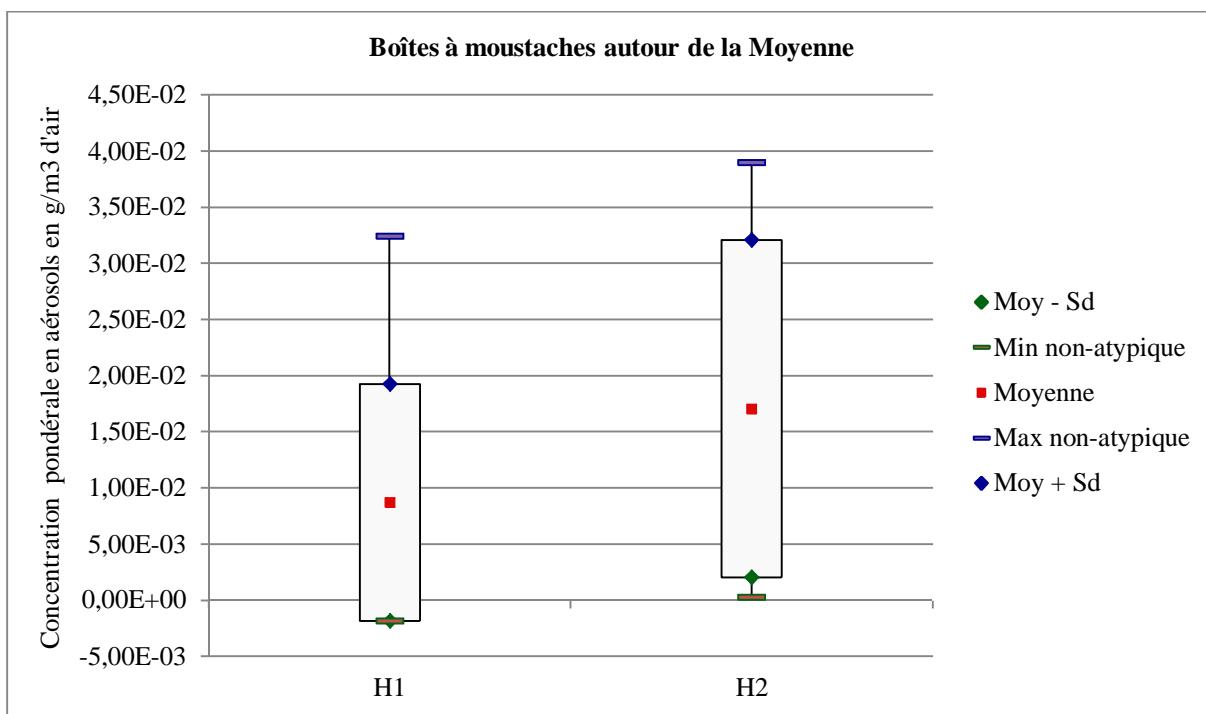
Comme expliqué précédemment, la mesure des concentrations pondérales en aérosols alvéolaires ne s'est pas avérée fiable lors des deux premières séances. En effet, ce mode de prélèvement n'autorise que la collecte des aérosols dont le diamètre est inférieur à $4 \mu\text{m}$. Compte tenu de la masse infime de ces particules, du temps de prélèvement relativement court limité à 90 minutes, nous avons décidé de procéder à la mesure des concentrations pondérales en aérosols dans l'air total pour les 4 séances suivantes. Parallèlement, nous avons poursuivi la quantification de *Rhodococcus equi* dans l'air alvéolaire en y adjointant celle dans l'air total.

Figure n° 23: Concentrations pondérales en aérosols de l'air total (en g/m³ d'air) cumulées sur 4 séances de prélèvements selon chaque type de surface et haras



D'après la figure n° 23, nous observons que les concentrations pondérales en aérosols dans l'air total sont plus élevées dans le haras H2 que le haras H1. Nous avons donc comparé les mesures des concentrations en poussières dans l'air pour chaque haras (figure n° 24). Pour chaque haras, les données concernent les trois surfaces : box, champ et paddock. L'hypothèse H0 est que « les concentrations moyennes de poussières mesurées dans le haras H1 et H2 ne sont pas significativement différentes ». L'analyse statistique complète est présentée en annexe n° 22.

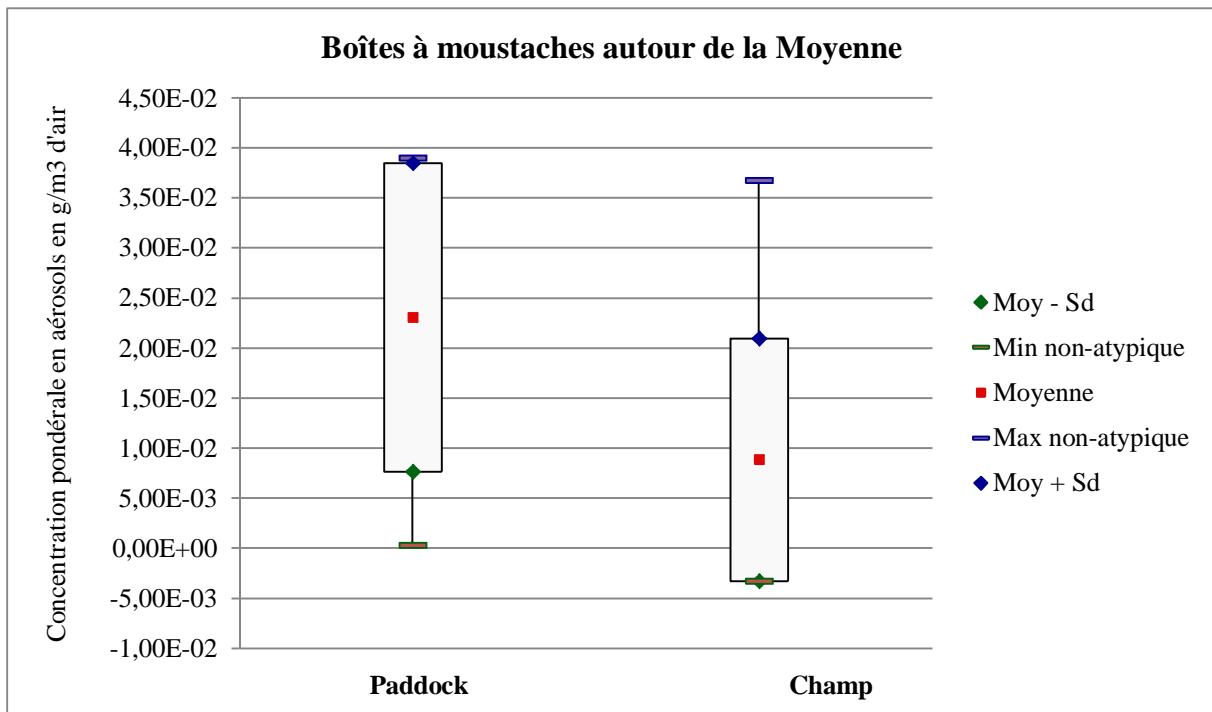
Figure n° 24: Résultats du test Mann-Whitney. Illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent la concentration pondérale de poussières en g/m³ d'air



La valeur de Z calculée avec le test de Mann-Whitney est trop faible pour rejeter l'hypothèse H0. Nous en concluons donc que les concentrations en poussières dans l'air des deux haras ne sont pas significativement différentes.

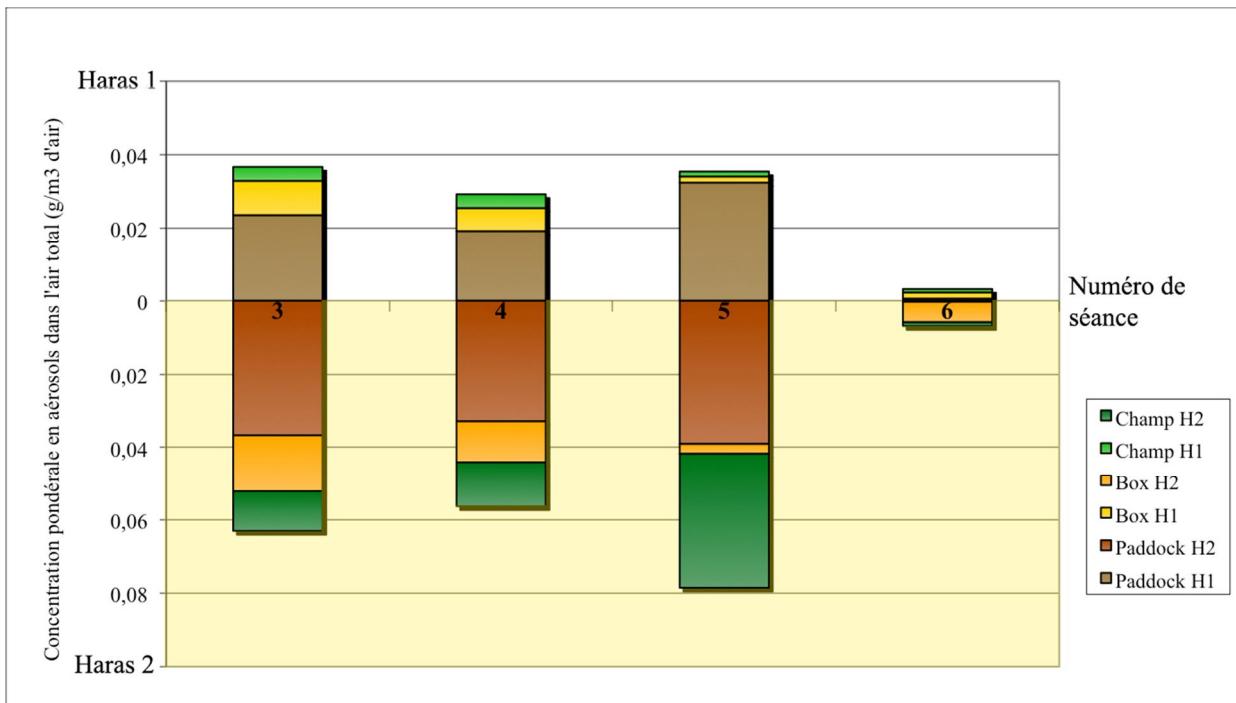
D'après la figure n° 23, nous remarquons également que les paddocks semblent être les surfaces dans lesquelles les poulains sont les plus exposés à la poussière et ce dans les deux haras. Notre hypothèse H0 est que « les concentrations moyennes de poussières mesurées dans les paddocks et dans les champs ne sont pas significativement différentes ». L'analyse statistique chiffrée est présentée en annexe n° 23. La figure n° 25 présente les résultats sous forme graphique.

Figure n° 25: Résultats du test Mann-Whitney. Illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent la concentration pondérale de poussières en g/m³ d'air



Nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse H0. Nous en concluons donc que les concentrations en poussières dans l'air du paddock et du champ ne sont pas significativement différentes. Bien qu'il existe une différence entre les concentrations pondérales d'aérosols obtenues entre le haras H1 et H2 ainsi que pour celles obtenues entre les paddocks et les champs, nos valeurs ne sont pas significativement différentes. Cela est probablement dû à la taille réduite de nos effectifs. Nous avons étudié l'évolution de la concentration pondérale en aérosols en fonction des séances pour chaque haras.

Figure n° 26: Concentration pondérale en aérosols dans l'air total en fonction du numéro de la séance, de la surface étudiée et du haras. Les histogrammes au-dessus de l'axe horizontal central représentent les valeurs obtenues pour le haras H1 et ceux en-dessous, les valeurs du haras H2



Comme nous l'avons visualisé sur la figure n° 26, les concentrations pondérales de poussières en aérosols de l'air total semblent être plus élevées dans le haras H2 que dans le haras H1. Cependant, les séances étant réalisées sur deux jours successifs, nous nous devons de rester prudents car la météorologie peut être variable selon chaque haras. Pour les séances n° 3 et n° 4, nous avons bénéficié d'un temps sec et ensoleillé alors que la séance n° 6 a été marquée par des précipitations importantes durant les phases de prélèvements. Pour chaque prélèvement, nous avons caractérisé simplement la météorologie par un temps « sec » ou « pluvieux ». Sans surprise, nous constatons que les concentrations pondérales en aérosols sont bien plus élevées par temps sec que lorsqu'il y a des précipitations. En ce qui concerne la séance n° 5, le temps été ensoleillé le jour de la séance de prélèvements dans le haras H2 mais pluvieux dans le haras H1. Pourtant dans le paddock du haras H1 ce jour, nous avons mis en évidence une concentration de poussières en aérosols élevée. La météorologie n'affecte pas de manière conséquente la concentration en aérosols au box.

Parallèlement à cette quantification, nous avions tenté une approche qualitative de la concentration pondérale en aérosols pour chaque prélèvement. Ainsi, les deux mêmes opérateurs au cours de l'étude ont attribué une lettre pour chaque prélèvement. La lettre « A » signifie qu'aucune poussière visible ne se dégage de la surface. La lettre « B » signifie que le terrain est relativement poussiéreux, c'est-à-dire que de la poussière s'élève lors du passage des chevaux. La lettre « C » a été attribuée lorsque la surface était très poussiéreuse, c'est-à-dire lorsque de la poussière était présente même en l'absence de sollicitation de la part de chevaux présents. L'attribution d'un signe « + » ou « - » permet de d'affiner l'évaluation qualitative pour chaque lettre si nécessaire en notant respectivement une amélioration ou une

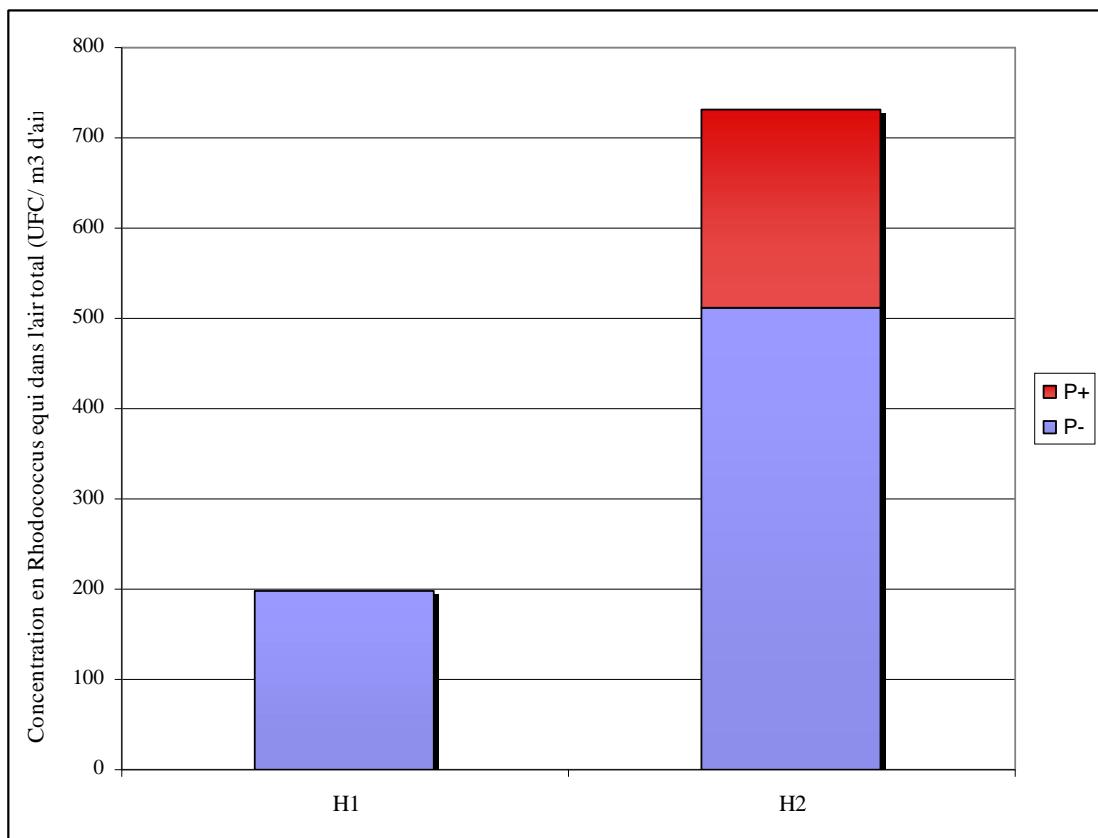
dégradation au sein de la même catégorie. Aussi nous avons constaté une excellente concordance entre les évaluations qualitative et quantitative. En effet, pour chaque surface, les lettres signant une présence plus importante de poussières sont associées avec les concentrations pondérales en aérosols les plus élevées. Dans le cadre d'une étude à grande échelle, une appréciation de la quantité de poussière à l'œil nu est donc envisageable pour alléger un protocole.

3.5.6 Analyse des concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air

3.5.6.1 Comparaison selon le type de haras

Pour chaque surface et chaque haras, nous avons déterminé la concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans l'air total et l'air alvéolaire au cours de 4 séances. Pour tous les prélèvements réalisés avec les CIP 10 M et CIP 10 MR, nous avons recueilli un volume suffisant de BHI. Cela confirme que le temps de prélèvement d'une heure et demie est correctement adapté et que les mouvements qu'ont subis les appareils lors des prélèvements n'ont pas provoqué de perte importante de volume.

*Figure n° 27: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans l'air total selon chaque haras. Données cumulées pour les séances 3 à 6*



La figure n° 27 présente les concentrations cumulées en *Rhodococcus equi* pour l'ensemble des surfaces sur 4 séances. D'après ce graphique nous observons que *Rhodococcus equi* non virulent est présent dans l'air dans les deux haras mais que *Rhodococcus equi* virulent est uniquement présent dans le haras H2. Nous avons étudié la validité de l'hypothèse H0 : « La présence de *Rhodococcus equi*, virulent ou non, dans l'air n'est pas liée au type de haras ». Le nombre de prélèvements total comptabilisé est celui obtenu pour les prélèvements dans l'air total. Nous avons retenu les valeurs pour deux surfaces : le champ et le paddock. En effet à aucun moment, nous n'avons détecté *Rhodococcus equi* dans l'air d'un box. Le tableau de contingence avec lequel le test exact de Fisher a été réalisé est présenté ci-dessous (tableau n° 52).

*Tableau n° 52: Nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi* virulent ou non a été mis en évidence dans l'air total*

	H1	H2	Total
Présence de <i>R.equi</i>	4	6	10
Absence de <i>R.equi</i>	4	2	6
Total	8	8	16

Les résultats du test de Fisher montrent que p bilatéral < 0,61. Cela ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse H0. En conclusion, la fréquence de présence de *Rhodococcus equi* dans l'air ne constitue pas une différence significative entre les deux haras.

De plus, nous avons étudié la validité de l'hypothèse H0 : « La présence de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air n'est pas liée au type de haras ». Le tableau de contingence est présenté ci-dessous dans le tableau n° 53.

*Tableau n° 53: Nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi* virulent a été mis en évidence dans l'air*

	H1	H2	Total
Présence de P+	0	5	5
Absence de P+	8	3	11
Total	8	8	16

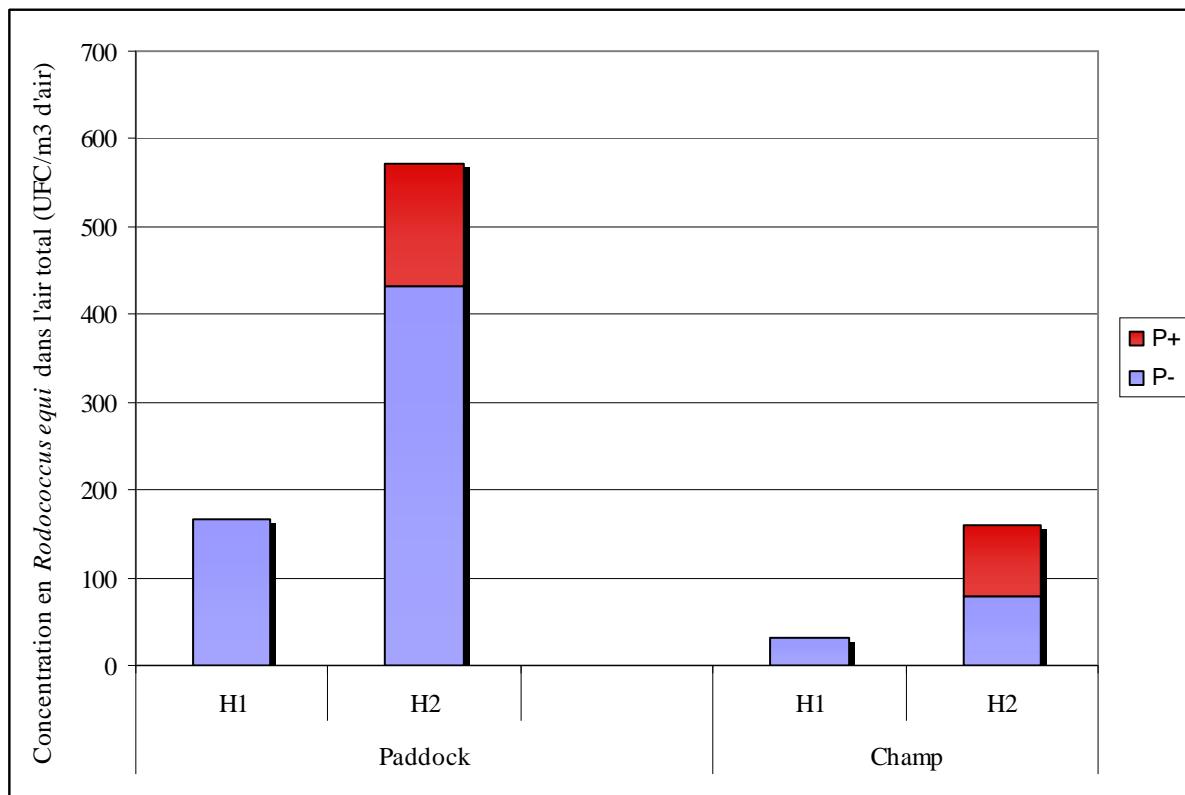
Nous avons utilisé de test de Fisher. Il ressort que nous pouvons rejeter l'hypothèse H0 avec le risque $p < 0,013$ de commettre une erreur. En conclusion, nous retenons que la présence de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air est significativement liée au statut du haras. Nous avons donc mis en évidence un paramètre mesurable qui différencie les deux haras selon qu'il s'agit d'un haras sain ou contaminé.

Dans une étude dans 22 élevages contaminés, des prélèvements d'air ont été effectués avec un collecteur d'air à impaction (Muscatello *et al.*, 2006a). Parmi les 768 prélèvements effectués, les concentrations en *Rhodococcus equi* total au paddock varient entre 0 et 124 UFC/m³ d'air collecté et leur médiane est de 2 UFC/m³ d'air. Les valeurs dans cette étude sont plutôt inférieures à celles que nous avons mesurées dans l'air du paddock du haras H2. À titre de comparaison, nous avons mesuré des concentrations s'échelonnant de 0 à 387 UFC/m³ pour une valeur moyenne de 38,8 UFC/m³.

3.5.6.2 Comparaison selon le type de surface

Nous avons également étudié les relations entre le type de surface concernée et *Rhodococcus equi* dans l'air total.

Figure n° 28: Concentrations cumulées en Rhodococcus equi virulents et non virulents dans l'air total selon chaque surface et chaque haras. Données cumulées pour les séances 3 à 6.



D'après la figure n° 28, nous constatons que dans chaque haras, les concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air total semblent être plus importantes dans les paddocks que dans les champs. Il est important de noter que nous n'avons jamais isolé *Rhodococcus equi* dans l'air lors des prélèvements en box et ce dans aucun des deux haras. Nous précisons que la moitié des prélèvements au box dans le haras H2 a été réalisée avec une jument et son poulain tous deux porteurs de *Rhodococcus equi* virulents dans leurs fèces. Devant ce résultat contradictoire avec une étude antérieure (Muscatello *et al.*, 2006a), nous avons décidé de mener une expérience complémentaire (cf. 3.8).

Afin d'étudier les relations entre *Rhodococcus equi* et le type de surface, l'hypothèse H0 retenue est : « La présence de *Rhodococcus equi*, virulent ou non, dans l'air n'est pas liée au type de surface ». Au vu des faibles effectifs, nous avons analysé les données avec le test exact de Fisher (tableau n° 54).

*Tableau n° 54: Nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi*, virulent ou non, a été mis en évidence dans l'air total selon chaque surface*

	Paddock	Champ	Total
Présence de <i>R.equi</i>	6	4	10
Absence de <i>R.equi</i>	2	4	6
Total	8	8	16

D'après les résultats du test de Fisher, *Rhodococcus equi* n'est pas plus fréquemment retrouvé dans l'air du paddock que dans celui du champ ($p<0,61$). De même, nous avons étudié la validité de l'hypothèse H0 : « *Rhodococcus equi* virulent est aussi fréquemment retrouvé dans les paddocks que dans le champ ». Au vu des faibles effectifs, nous avons analysé les données avec le test exact de Fisher (tableau n° 55).

*Tableau n° 55: Nombre de prélèvements où *Rhodococcus equi* virulent a été mis en évidence dans l'air total selon chaque surface*

	Paddock	Champ	Total
Présence de <i>P+</i>	4	1	5
Absence de <i>P+</i>	4	7	11
Total	8	8	16

D'après les résultats du test de Fisher, *Rhodococcus equi* virulent n'est pas plus fréquemment retrouvé dans l'air du paddock que dans celui du champ (p bilatéral $<0,15$).

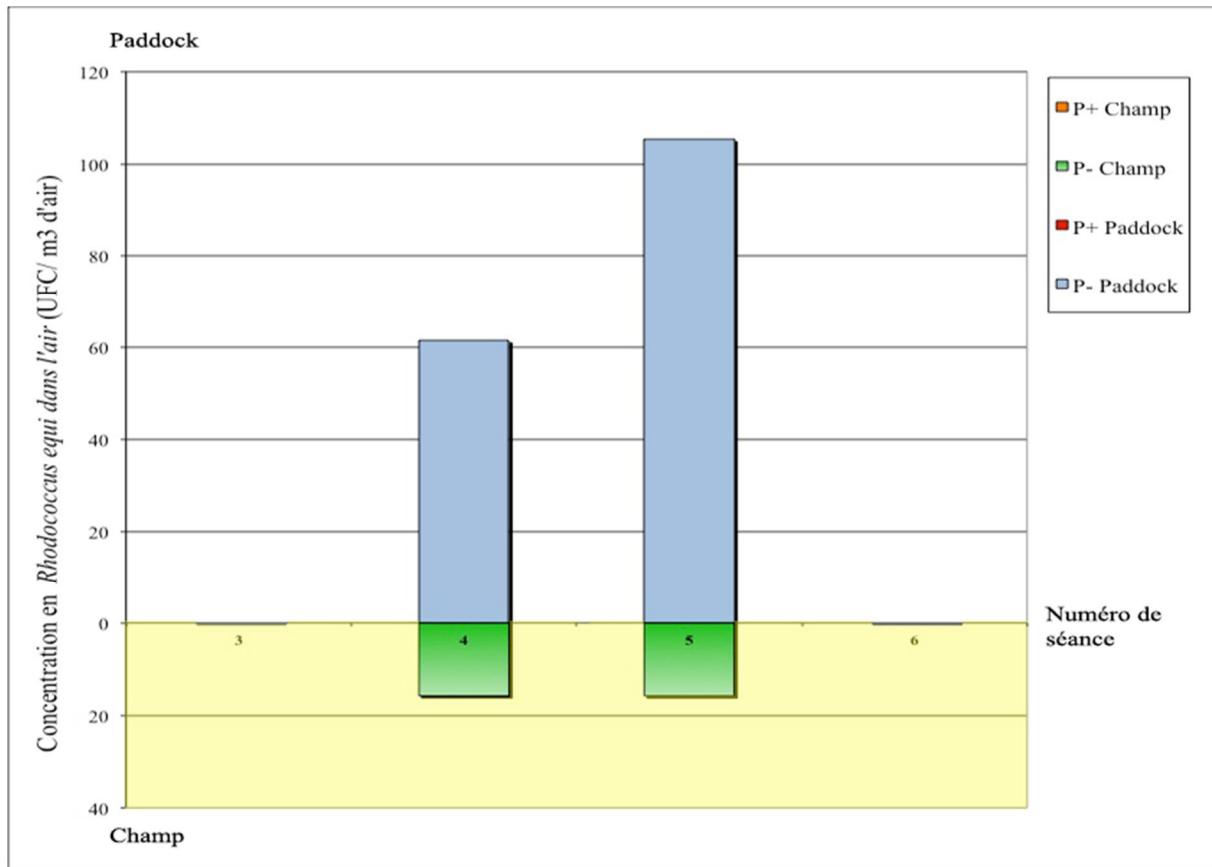
D'une manière générale, cette série de tests statistiques connaît deux limites. La première est que, de par la classification en présence ou absence pour chaque prélèvement, nous n'établissons pas de différence entre un faible et une forte concentration. La seconde limite concerne le nombre restreint de prélèvements effectués. Il serait intéressant d'étudier ces relations dans une enquête à plus grande échelle.

Dans une autre étude évaluant l'impact du site de collecte sur les concentrations mesurées (Kuskie *et al.*, 2011), les concentrations en *Rhodococcus equi* virulent atteignent 16 UFC/m³ au box et 8 UFC/m³ au paddock. De même, une seconde étude a mis en évidence des concentrations s'échelonnant de 0 à 9,5 UFC/m³ d'air dans le paddock et de 0 à 39,8 UFC/m³ d'air dans les box de 3 élevages affectés (Muscatello *et al.*, 2006b). Les valeurs que nous avons mesurées dans le paddock du haras H2 sont plus élevées (34,66 UFC/m³ en moyenne dans le paddock du haras H2). Cette différence est probablement due au mode de prélèvement. En effet, même si le mode d'identification de la bactérie diffère de celui que nous avons utilisé, le protocole nécessite une incubation pendant 48 heures et donc la viabilité de la bactérie.

3.5.6.3 Évolution au cours du temps

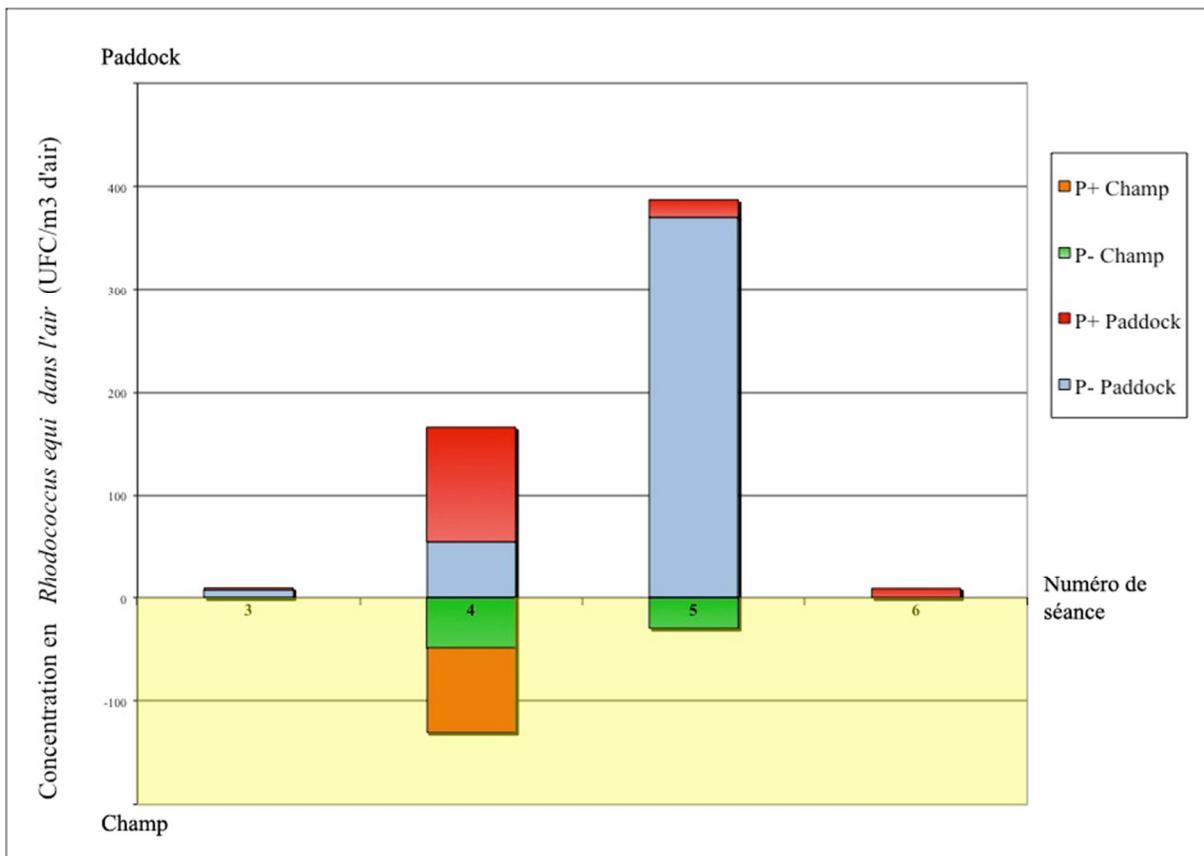
Étudions à présent les concentrations en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents en fonction du temps.

Figure n° 29: : Concentration en Rhodococcus equi virulents et non virulents dans l'air total en fonction du numéro de séance pour le haras H1. En ordonnées vers le haut sont représentées les valeurs pour le paddock tandis que celles pour le champ sont représentées vers le bas



En analysant la figure n° 29, nous constatons que *Rhodococcus equi* est présent ou absent de manière simultanée dans l'air du champ et du paddock. Ce résultat souligne l'influence des conditions environnementales qui sont communes aux deux surfaces le jour du prélèvement.

Figure n° 30: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans l'air total en fonction du numéro de séance pour le haras H2. En ordonnées vers le haut sont représentées les valeurs pour le paddock tandis que celles pour le champ sont représentées vers le bas

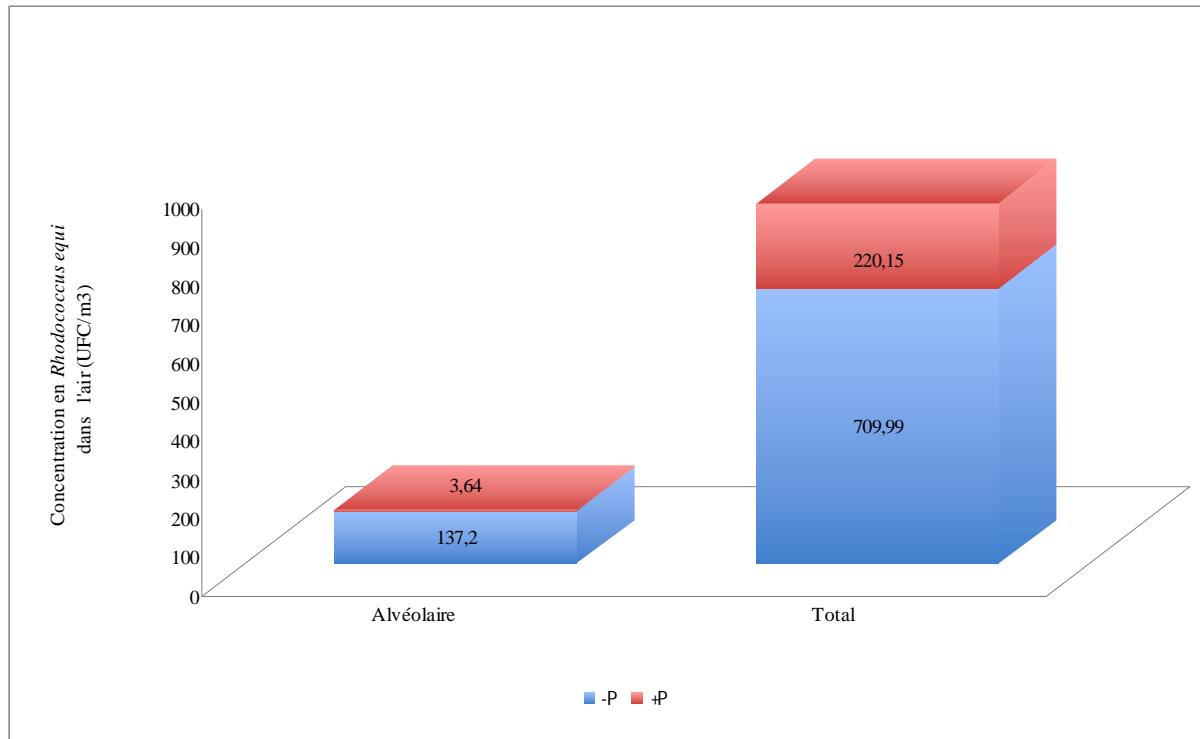


D'après la figure n° 30, nous constatons la présence de *Rhodococcus equi* dans le paddock lors des quatre séances. Cependant, la bactérie est présente de manière plus marquée lors des séances n° 4 et n° 5. Lors de la séance n° 4, nous observons que la proportion de *Rhodococcus equi* virulent est très importante que ce soit dans l'air du champ ou du paddock. De nouveau, ce résultat souligne l'influence probable des conditions environnementales.

3.5.6.4 Comparaison selon la fraction de l'air

Désormais, nous allons nous intéresser à la répartition de *Rhodococcus equi* dans les fractions de l'air. En effet, l'utilisation simultanée du CIP 10 MR et du CIP 10 M permet de comparer les résultats obtenus pour la mesure de la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air alvéolaire et l'air total.

Figure n° 31: Concentrations cumulées en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents selon que le l'échantillonnage est réalisé dans l'air total ou bien sa fraction alvéolaire



D'après la figure n° 31, nous constatons que les concentrations en *Rhodococcus equi* dans la fraction alvéolaire sont bien inférieures à celles mesurée dans l'air total. Ce résultat était attendu, puisque la fraction alvéolaire est une partie de l'air total. En ce qui concerne la répartition des *Rhodococcus equi* virulents, nous observons qu'ils sont également présents dans la fraction alvéolaire, dans une moindre proportion que celle dans l'air total, mais il nous est impossible d'en tirer des conclusions.

Nous avons étudié la validité de l'hypothèse H0 : « *Rhodococcus equi* est retrouvé aussi fréquemment dans la fraction alvéolaire de l'air que dans l'air total ». Les effectifs sont présentés au tableau n° 56.

Tableau n° 56: Nombre de fois où *Rhodococcus equi*, virulent ou non, a été isolé dans l'air selon la fraction de l'air mesurée

	Air alvéolaire	Air total	Total
Présence de <i>R.equi</i>	7	10	17
Absence de <i>R.equi</i>	9	6	15
Total	16	16	32

Les résultats du test d'indépendance du χ^2 montre que $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{lim}}$ avec $\chi^2_{\text{calc}} = 1,129$ et $\chi^2_{\text{lim}} = 3,841$ et $p < 0,29$. Cela ne nous permet pas de rejeter l'hypothèse H0. En conclusion, *Rhodococcus equi* n'est pas plus fréquemment retrouvé dans l'air total que dans l'air alvéolaire de manière significative ($p < 0,05$). La validité de cette hypothèse en prenant en compte *Rhodococcus equi* virulent a été également étudiée (tableau n° 57).

Tableau n° 57: Nombre de fois où *Rhodococcus equi* virulent a été isolé dans l'air selon la fraction de l'air mesurée

	Air total	Air alvéolaire	Total
Présence de <i>P+</i>	5	1	6
Absence de <i>P+</i>	11	15	26
Total	16	16	32

Compte tenu des faibles effectifs, le test de Fisher a été utilisé. Les résultats ne permettent pas de rejeter H0 (p bilatéral < 0,17). En conclusion *Rhodococcus equi* virulent n'est pas plus souvent isolé dans l'air total que l'air alvéolaire.

De nouveau, le nombre de prélèvements que nous avons effectué est limité. De plus les statistiques effectuées sur le nombre de prélèvements positifs ne reflètent pas les valeurs des concentrations obtenues.

Cependant, dans l'optique d'une réduction du protocole dans le cadre d'une étude à plus grande échelle, il faudra probablement privilégier les prélèvements d'air total pour avoir plus de chances de détecter *Rhodococcus equi*.

3.5.7 Étude de la relation entre la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et certains paramètres climatiques ou de terrain

Nous avons testé l'existence d'une corrélation entre des facteurs environnementaux et la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air. La concentration en *Rhodococcus equi* est celle mesurée dans l'air total. Nous avons pris en compte les souches virulentes et non virulentes. Nos relevés effectués pour chaque prélèvement permettent d'étudier l'existence de cette corrélation pour chaque haras. Ainsi, les paramètres retenus sont l'hygrométrie ambiante, la température ambiante ainsi que les précipitations cumulées au cours du prélèvement et celles cumulées entre deux séances de prélèvements. Au début de l'étude, nous avions tenté de quantifier la surface d'enherbement au sol en mètres carrés. Dès la deuxième séance, nous avons constaté que cette mesure était difficile à mettre en œuvre compte tenu de l'évolution disparate des densités d'enherbement. Cette mesure malgré les photographies réalisées de chaque zone restait donc très subjective. Elle a été rapidement abandonnée. Les précipitations cumulées durant la durée du prélèvement ont été obtenues auprès des stations météo France les plus proches des haras selon des données horaires.

Les valeurs du coefficient de corrélation de Spearman obtenues pour l'étude de la relation entre concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et l'hygrométrie ambiante ne permettent pas de conclure à une corrélation importante (-0,230 pour H1 et -0,00719 pour H2). Un coefficient de corrélation négatif permet simplement de supposer que plus l'hygrométrie est élevée, plus la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air est faible.

Les valeurs du coefficient de corrélation de Spearman obtenues pour l'étude de la relation entre concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et la température ambiante ne permettent pas de conclure à une corrélation importante (0,370 pour H1 et 0,180 pour H2). Un coefficient de corrélation positif permet simplement de supposer que plus température est élevée, plus la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air est élevée.

Enfin, les valeurs du coefficient de corrélation de Spearman obtenues pour l'étude de la relation entre concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et les précipitations cumulées durant la durée de prélèvement ne permettent pas de conclure à une corrélation (0,245 pour H1 et -0,541 pour H2). Les valeurs des précipitations cumulées se mesurent en dixième de millimètre pour la durée d'un prélèvement. Nous pensons donc que la durée de prélèvement est bien trop faible pour pouvoir en faire une quelconque interprétation.

En conclusion, il y a sans doute un lien entre les conditions environnementales et la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air mais nous n'avions pas un nombre de données suffisantes pour pouvoir le mettre en évidence statistiquement. En 2011, Kuskie *et al.* ont étudié le lien entre la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et l'hygrométrie, l'anémométrie et la température ambiante concluant à une absence de corrélation entre ces facteurs et la concentrations mesurées.

3.5.8 Étude de la relation entre la concentration de poussières en aérosols et la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air

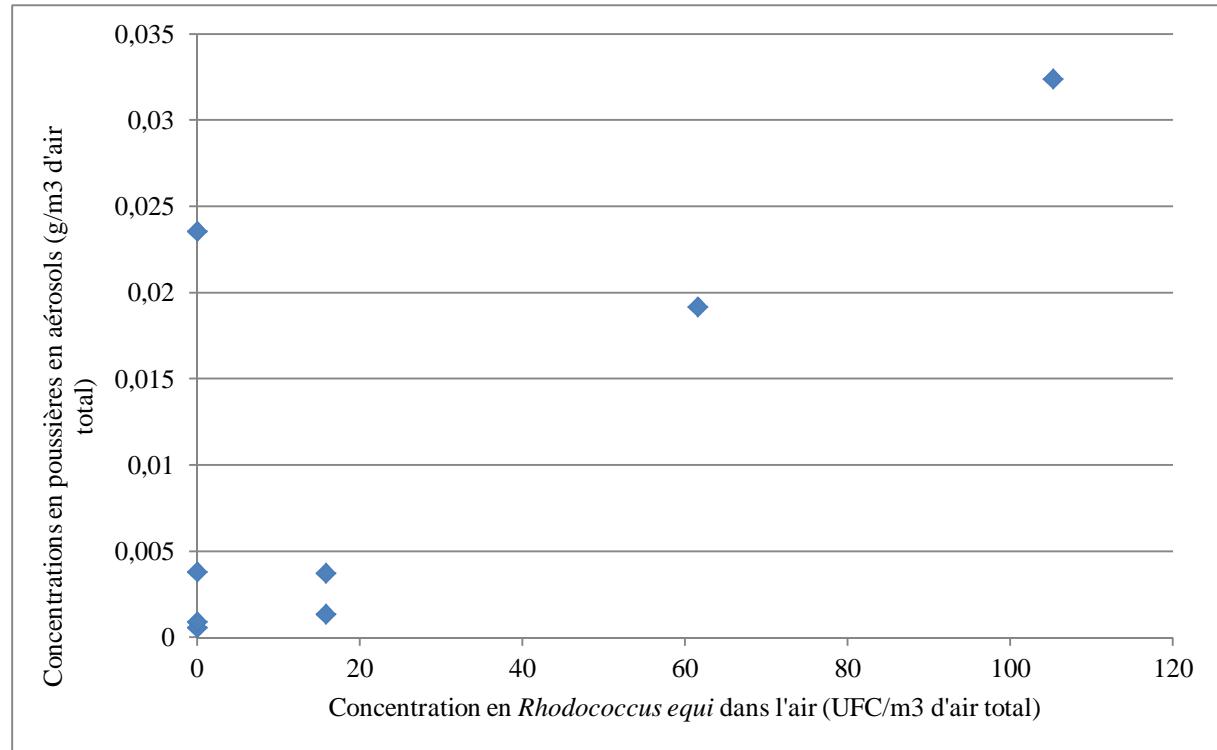
Différentes études rapportent que la présence de poussières dans l'environnement des poulains constitue un facteur de risque important (Muscatello *et al.*, 2006a ; Cohen *et al.*, 2005; Tapprest *et al.* 2012). Pourtant aucune mesure de la concentration pondérale en aérosols n'a été effectuée jusqu'alors. La quantification simultanée de la concentration en *Rhodococcus equi, virulent ou non*, dans l'air et de la concentration pondérale en aérosols autorise l'étude du lien entre ces deux paramètres. Nous avons travaillé dans l'air total pour ces deux mesures.

Nous avons constaté que, pour la sixième séance, les concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air sont extrêmement faibles voire nulles (figures). Parallèlement, la concentration pondérale en aérosols est elle aussi très faible pour cette séance (figure n° 26). Nous étudions le lien éventuel entre ces deux paramètres en calculant le coefficient de corrélation de Spearman. Cependant compte tenu des effectifs réduits, nous ne pouvons admettre une distribution normale de la somme des rangs. Nous nous reportons donc directement à la table du coefficient de corrélation de Spearman.

Ainsi pour le haras H1, le coefficient calculé est de 0,511. L'intervalle de confiance à 95% est [-0,303 ; 0,894]. Le coefficient de détermination est de 26,1%. Étant donné que $|0,511| < 0,74$, nous ne pouvons pas rejeter H_0 . Nous concluons qu'il n'existe pas de relation significative avec comme limite la faible taille de nos effectifs.

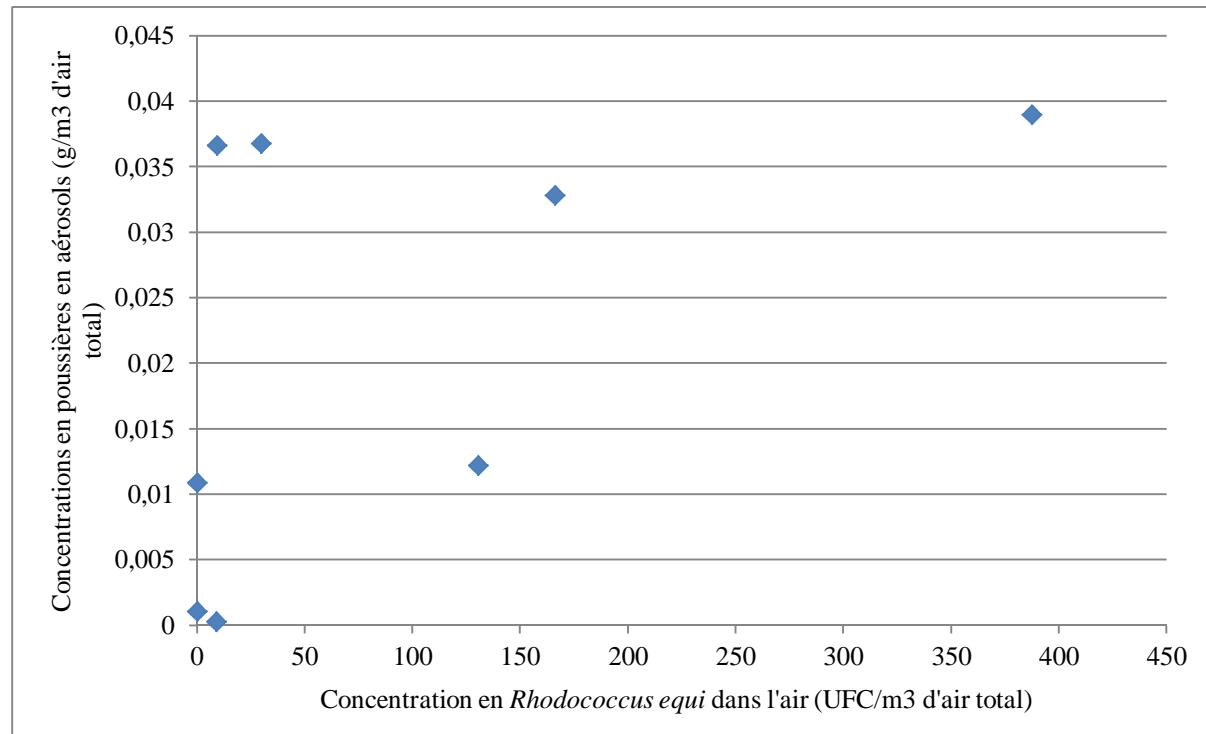
Les figures n° 32 et n° 33 sont les représentations graphiques des tests de corrélation de Spearman pour les haras H1 et H2.

Figure n° 32: Résultats graphiques du test de corrélation de Spearman pour l'étude de la corrélation entre concentrations pondérales en aérosols et concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air dans le haras H1



Ainsi pour le haras H2, le coefficient calculé est de 0,732. L'intervalle de confiance à 95% est [0,0533 ; 0,947]. Le coefficient de détermination est de 53,4%. Étant donné que $|0,731| < 0,74$, nous ne pouvons pas rejeter H0. Nous concluons qu'il n'existe pas de relation significative avec comme limite la faible taille de nos effectifs.

Figure n° 33: Résultats graphiques du test de corrélation de Spearman pour l'étude de la corrélation entre concentrations pondérales en aérosols et concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air dans le haras H2



À titre indicatif, nous avons également calculé les coefficients de corrélation de Spearman pour chaque surface, paddock et champ pour les deux haras confondus. Le coefficient calculé pour les paddocks est de 0,695 et celui pour les champs est de 0,600.

D'un point de vue purement statistique, nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation entre la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et la concentration pondérale en aérosols ($p < 0,05$). Cependant, les coefficients de corrélation calculés sont tous fortement positifs tendant malgré tout à montrer que plus la concentration pondérale en aérosols est élevée, plus la concentration en *Rhodococcus equi* est importante. De plus nous pouvons distinguer deux facteurs qui peuvent venir affecter cette relation. En premier lieu, nous retiendrons que nos effectifs sont restreints et que nous avons aussi bien utilisé les valeurs dans le champ que celles mesurées dans le paddock pour calculer ce coefficient. Pourtant les concentrations en *Rhodococcus equi* dans le sol sont différentes selon la surface (figure n° 15). En second lieu, la présence de *Rhodococcus equi* dans le sol, que nous supposons être responsable de celle dans l'air par aérosolisation, varie au cours du temps (figure n° 22). C'est à dire que la corrélation est calculée pour une concentration pondérale d'aérosols dans l'air alors que la source de *Rhodococcus equi* dans le sol est susceptible de varier de manière indépendante. Les coefficients de corrélation de Spearman calculés laissent à penser qu'il faut réitérer ces prélèvements un plus grand nombre de fois afin d'obtenir une conclusion statistiquement significative. Idéalement, ceux-ci ne devraient se faire que sur une seule surface, dans une période de temps réduite afin de diminuer l'influence des variations de concentrations de *Rhodococcus equi* dans le sol. Néanmoins, ces premiers résultats tendent à

montrer qu'il est possible d'objectiver le rôle déterminant joué par les poussières. Aussi, il faut souligner l'intérêt de ce paramètre quantitatif cumulatif mesuré sur la durée de prélèvement de *Rhodococcus equi* dans l'air. En effet, certaines études (Muscatello *et al.*, 2006a) se sont attachées à étudier cette relation entre concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air avec un paramètre qualitatif ou bien un paramètre quantitatif ponctuel tel que l'humidité du sol, la hauteur de l'herbe, le pH du sol, l'hygrométrie ambiante, la température ambiante, la texture du sol ou bien la vitesse du vent. La concentration pondérale d'aérosols dans l'air est une combinaison de tous ces paramètres et rend obsolète l'idée de d'établir une corrélation avec un seul de ces paramètres (Takai *et al.*, 1987). La mesure de la concentration pondérale en aérosols intègre probablement d'autres paramètres tels que la densité de chevaux. Son principal défaut est que la mesure est indépendante de la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol et qu'elle ne peut pas remplacer la mesure de *Rhodococcus equi* dans l'air. La réalisation de cette mesure embarquée est particulièrement intéressante puisqu'elle reflète l'exposition aux aérosols du cheval notamment lorsqu'il s'alimente ou se déplace.

3.5.9 Étude de la relation entre la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air et la concentration de *Rhodococcus equi* dans le sol aux faibles profondeurs

La source de *Rhodococcus equi* dans le sol joue un rôle important. Nous avons étudié l'existence d'une corrélation entre les concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air et celle dans le sol aux faibles profondeurs (en surface et à 5 cm) pour chaque haras. La comparaison de la figure n° 34 avec la figure et celle de la figure n° 35 avec la figure n° 30 ne permet pas *a priori* de suspecter une telle corrélation. Nous avons tout de même calculé les coefficients de Spearman pour chaque haras. Ainsi, pour le haras H1, nous avons un coefficient de 0,283. Pour le haras H2, ce coefficient est de 0,110. Étant donné que $|V_{\text{calc}}| < 0,74$, nous ne pouvons pas rejeter H0. Il n'y a donc pas de lien statistiquement significatif entre la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol aux faibles profondeurs et celle dans l'air. Ce résultat peut s'expliquer car certaines conditions environnementales sont certainement nécessaires pour que la bactérie puisse être retrouvée dans l'air. Ainsi si la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol est élevée mais que le temps est pluvieux, la bactérie a peu de chances d'être isolée dans l'air ; c'est le cas de la séance n° 6. Ces observations soulignent l'intérêt de mesurer la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air.

Figure n° 34: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans la portion superficielle du sol (surface et 5 cm) au cours du temps pour le haras H1. Les valeurs mesurées dans le paddock sont représentées en ordonnées vers le haut, celles du champ vers le bas

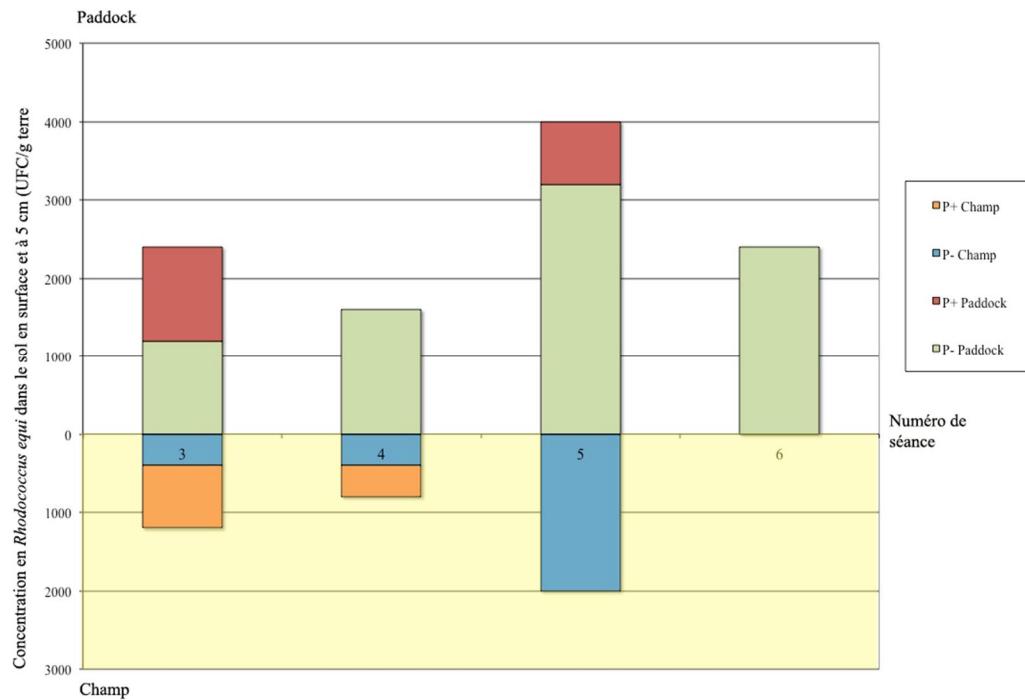
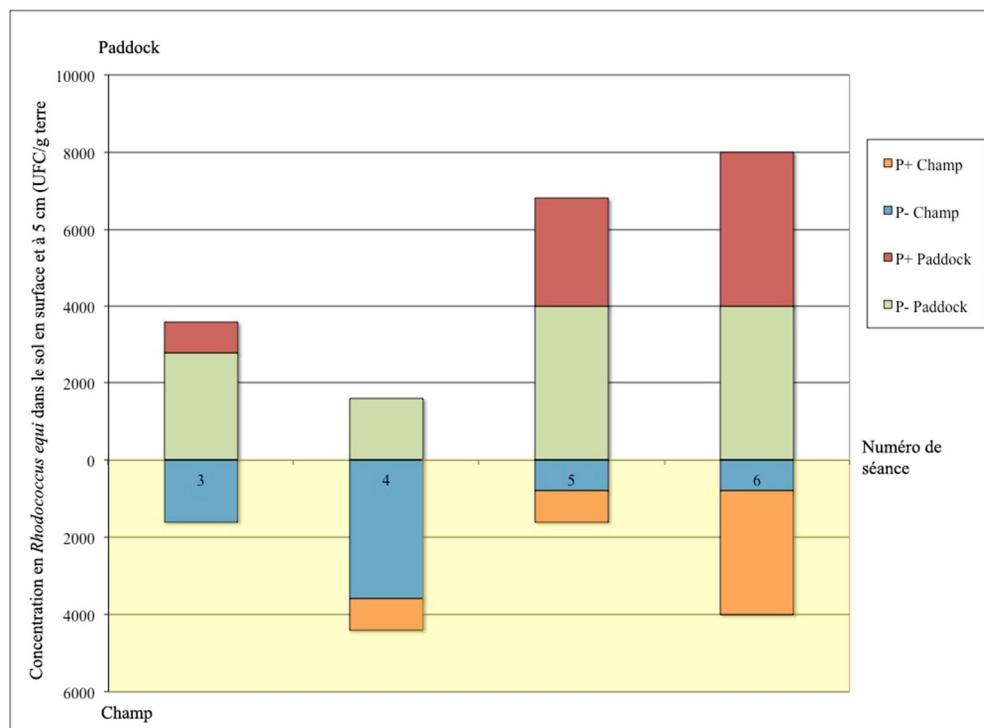


Figure n° 35: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans la portion superficielle du sol (surface et 5 cm) au cours du temps pour le haras H2. Les valeurs mesurées dans le paddock sont représentées en ordonnées vers le haut, celles du champ vers le bas



3.6 EXPÉRIENCE COMPLÉMENTAIRE

Au cours des prélèvements menés dans les box dans les deux haras, nous n'avons jamais mis en évidence *Rhodococcus equi* dans l'air ni au sol avec les lingettes, y compris lors de prélèvements avec des couples porteurs de *Rhodococcus equi*. Aussi, nous avons décidé de réitérer la mesure des concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air total au box dans le haras H2 dans des conditions plus favorables à l'aérosolisation de *Rhodococcus equi*. Ainsi, ces prélèvements ont été réalisés dans un box paillé qui est curé au cours du prélèvement (photographie n° 66). C'est-à-dire que la litière sale et les crottins sont retirés par le palefrenier qui place ensuite de la paille propre. Au cours de cette opération, la jument et son poulain restent dans le box et sont laissés libres ou bien tenu en cas d'agitation excessive. De cette manière le prélèvement est réalisé dans un milieu pouvant être fortement contaminé car riche en crottins et dans lequel de nombreuses particules seront mises en suspension lors du paillage. En outre, ces prélèvements ont été menés simultanément dans deux box différents, à savoir avec une jument (H2-J3) et son poulain (H2-P3) porteur de *Rhodococcus equi* virulent (4×10^3 *R.equi*/ g de fèces) dans le premier box et avec une jument (H2-J19) et son poulain (H2-P19) atteint de rhodococcose dans le second (photographie n° 65).

Photographie n° 65: Mesure de la concentration en Rhodococcus equi dans l'air total dans le box d'un poulain porteur de Rhodococcus equi virulent.



Photographie n° 66: La jument est tenue pendant l'opération de curage du box

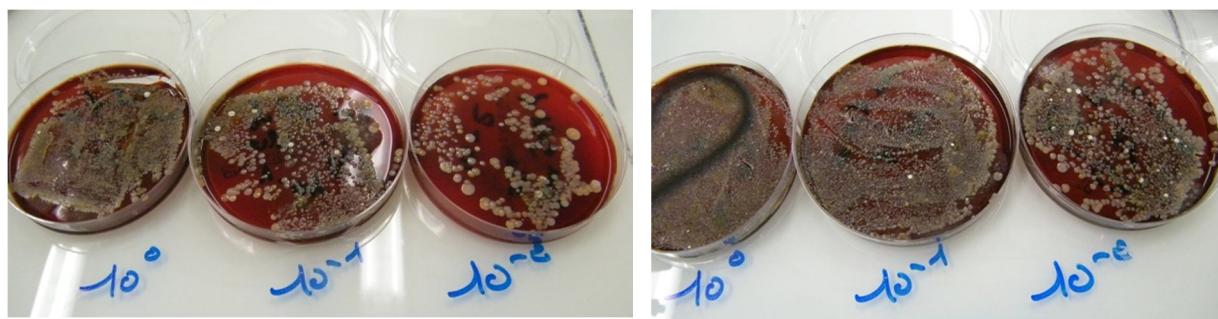


L'expérience s'est bien déroulée. Les résultats des mises en culture sont présentés à la photographie n° 67

Rhodococcus equi n'a été isolée dans aucune des cultures bactériologiques. Pourtant, la présence de très nombreuses colonies bactérienne et ce même à la dilution au centième

montre clairement que le paillage a provoqué une mise en suspension de nombreuses bactéries dans l'air.

Photographie n° 67: Cultures bactériologiques après une semaine pour le box du poulain porteur à gauche et celui du poulain malade à droite



Malgré ces conditions propices à la présence de *Rhodococcus equi* au box et les conditions les plus favorables à son aérosolisation, nous n'avons pas isolé la bactérie dans cette expérience complémentaire. Ces résultats ne correspondent pas à ceux de la littérature dans laquelle *Rhodococcus equi* a été mis en évidence dans l'air du box à l'aide d'un collecteur d'air à impaction. Ainsi, les concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air du box sont 3 fois supérieures à celles mesurées dans le paddock d'un élevage atteint par la rhodococcose (Kuskie *et al.*, 2011) et les chances de détecter *Rhodococcus equi* virulent de le box d'un cheval atteint sont 17,3 fois supérieures que celles de le mettre en évidence au paddock (Muscatello *et al.*, 2006b). Il apparaît d'autant plus probable d'isoler *Rhodococcus equi* dans un milieu confiné comme un box à condition bien sûr qu'une source soit présente dans ce box. Bien qu'ayant travaillé pour les prélèvements sur cette surface 3 séances sur 6 avec un couple jument-poulain porteur de *Rhodococcus equi*, nous n'avons jamais mis en évidence *Rhodococcus equi* au sol avec les prélèvements grâce aux lingettes. Ceci est le premier élément marquant. De plus, dans les études mettant en évidence la bactérie dans l'air du box, l'appareil à impaction est situé au 5 centimètres du sol alors que dans notre étude il est porté sur la tête de la jument et donc davantage éloigné de la source potentielle. Pourtant nous avons facilement isolé la bactérie sur des surfaces en milieux extérieur ce qui est a priori plus difficile. La répartition des particules au sein du nuage d'aérosols est probablement différente selon que le milieu est paillé ou bien en terre. Nous n'avançons pas d'explication à ce jour pour expliquer ces résultats. Il faudrait renouveler cette série de prélèvement en essayant de fixer le CIP 10 M sur la tête d'un poulain ou bien en position fixe à proximité du sol.

3.7 DISCUSSION

En résumé, nous avons observé que le haras H2 cumule certains facteurs de risques de rhodococcose tels que la présence de juments extérieures de passage, une densité de juments et de poulains élevée sur le site, la présence d'une barre de contention dédiée à la gynécologie et son utilisation à la fois pour les juments résidentes et les juments de passage et des naissances tardives. Nous avons montré que *Rhodococcus equi* virulent était présent dans le sol des deux types de haras et en concentrations plus importantes dans les paddocks que dans les champs. *Rhodococcus equi* virulent se concentre davantage aux faibles profondeurs, c'est à dire en surface ou à 5 cm. Nous avons mis en évidence *Rhodococcus equi* virulent dans l'air du haras H2 alors qu'il était systématiquement absent dans l'air du haras H1. C'est le paramètre discriminant de l'étude différenciant les deux types de haras. Aucun paramètre météorologique ou de terrain n'est seul corrélé à la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air. Pour ce qui est des aérosols, nous pouvons supposer qu'ils jouent un rôle déterminant dans la présence de *Rhodococcus equi* dans l'air.

Après avoir discuté des résultats au paragraphe 3.8, nous discutons ici des points attenants à l'étude de manière générale.

Cette étude utilise une méthode nouvelle pour recueillir *Rhodococcus equi* dans l'air, au moyen d'un collecteur d'air à impingement. En effet, les études précédentes ont utilisé des collecteurs à impaction (Muscatello et Browning, 2004; Muscatello *et al.*, 2006b; Kuskie *et al.*, 2011) avec un débit d'aspiration de l'air de 100 litres par minute. Les conséquences de l'impaction sur la mise en culture des bactéries sur un milieu solide ont été étudiées (Stewart *et al.*, 1995). Ainsi, le taux de survie a été étudié en faisant varier la vitesse d'impaction et donc le débit d'aspiration pour des bactéries gram positives et gram négatives. Il apparaît que le taux de survie chute considérablement avec l'augmentation de la vitesse d'impaction. Ceci est davantage prononcé pour les bactéries gram négatives. Pour *Micrococcus luteus*, bactérie gram positive, le taux de survie est de 20 (+/-10)% à une vitesse d'impaction de 150 m/s, c'est à dire pour un débit d'aspiration de inférieur à 25 litres par minute. Parallèlement, une faible vitesse d'impaction, pour un débit d'aspiration inférieur à 10 l/h, ne permet pas une bonne pénétration des bactéries sur le milieu solide, favorisant ainsi sa dessiccation et réduisant son accès aux nutriments. Une étude comparant trois modes de prélèvement afin de recueillir *Legionella* dans l'air a montré que la collecte par impingement est 4 fois plus efficace que celle par impaction et 700 plus que celle par filtration (Deloge-Abarkan *et al.*, 2007). Enfin, l'utilisation du CIP 10 M permet de mesurer des concentrations plus importantes qu'avec un système par impaction car le stress mécanique sur les microorganismes est minimisé avec le procédé de collecte par impingement (Görner *et al.*, 2006). La méthode développée est donc fiable. Elle n'a pas présenté de danger pour les chevaux et a permis de s'approcher de l'exposition réelle du poulain au sein d'une surface. Nous avons jugé plus prudent de fixer les CIP sur la tête de la mère à proximité des naseaux d'autant plus qu'il s'agit de pur-sang, une race au tempérament vif. Globalement, les poulains sont restés proches de leurs mères au champ et au paddock. Il n'y a pas eu autant de phases de jeux seuls entre poulains que nous le redoutions. Nous pensons que le biais induit par la fixation des CIP sur la tête de la mère au champ et au paddock était minime. Pour ce qui est des prélèvements au box, les poulains avaient tendance à se reposer en position couchée et donc à proximité immédiate du sol alors que les mères restaient debout. De plus la partie supérieure de la porte du box est restée ouverte au cours du prélèvement. Ainsi, le milieu n'était pas véritablement confiné. De plus les juments pouvaient sortir leur tête à l'extérieur du box alors que les poulains restaient à l'intérieur. Le biais induit par le positionnement des CIP sur la tête

des juments est sans aucun doute plus important au box. Nous devons poursuivre ces investigations car certains éleveurs rapportent que des poulains ont contracté la rhodococcose alors qu'ils ne sont jamais sortis du box.

Entre outre, l'utilisation de ces appareils modulables permet de sélectionner la fraction de l'air à étudier. Ainsi, nous avons travaillé dans l'air total et dans la fraction alvéolaire pour notre étude. La buse chapotant la tête du CIP 10 et celle du CIP 10 M mesure 8 mm de diamètre. Dans notre protocole de mesure de la concentration pondérale en aérosols, nous avons retiré les éléments macroscopiques à l'aide d'une pince lors de l'ouverture des coupelles au laboratoire. Ces éléments, de type fine brindilles, ont été très rares. La fraction de l'air susceptible de pénétrer dans les voies respiratoires du poulain est appelée fraction inhalable. Environ 50% des aérosols d'une taille de 100 µm font partie de la fraction inhalable (figure n° 36). Le diamètre aérodynamique des particules capables de rester en suspension dans l'air s'échelonne de 0,005 à 100 µm. Compte tenu de cette donnée et de l'absence d'éléments macroscopiquement visibles, nous pouvons penser que les mesures réalisées dans l'air total peuvent être une approximation des mesures de la fraction inhalable. Cependant, nous aurions pu effectuer une détermination granulométrique pour connaître la taille des particules en suspension. Le mesurage de la concentration de *Rhodococcus equi* dans la fraction alvéolaire nous a permis d'établir une comparaison. Une version du CIP 10 permet d'effectuer l'échantillonnage de la fraction inhalable ; elle est appelée CIP 10 I. La figure n° 37 présente une coupe longitudinale de la tête avec la fente en forme de T permettant l'entrée et le passage des particules sans qu'il y ait de dépôts. Une étude a démontré l'efficacité de CIP 10 I adaptée pour la fraction inhalable (Görner *et al.*, 2009).

Figure n° 36: Comparaison entre les performances du CIP 10 I et la courbe inhalable théorique. Fraction d'aérosols pénétrant en fonction du diamètre aérodynamique de la particule

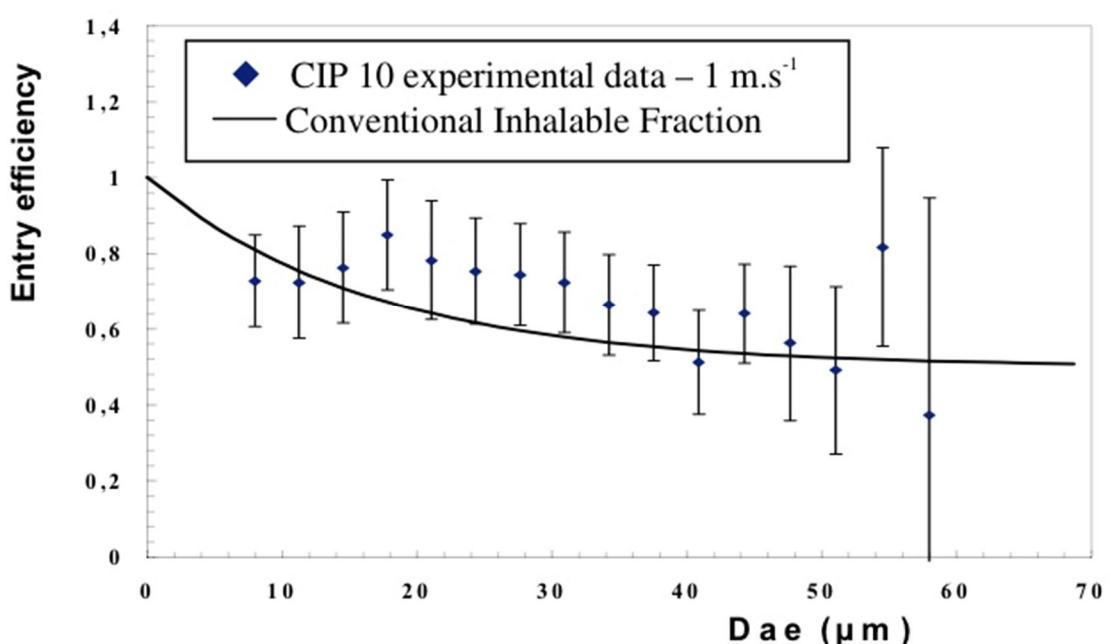
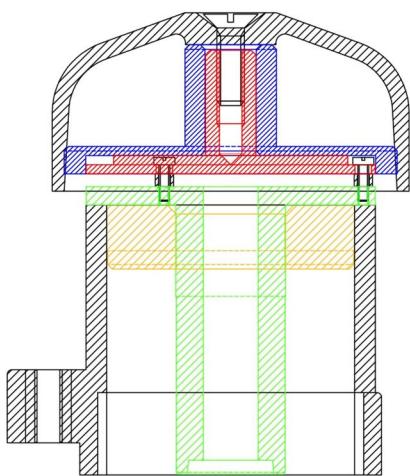


Figure n° 37: Vue en coupe longitudinale de la tête du CIP 10I. Dessin technique fourni par ARELCO



actuelles ne permettent pas de réaliser une conversion en UFC avec précision. Seule une approximation à un facteur 10 près est possible actuellement. Enfin, cela supposerait de pouvoir comparer le résultat obtenu avec une méthode de référence.

Une étude a mesuré les concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air exhalé des poulains affectés par la rhodococcose (Muscatello *et al.*, 2009) et a mis en évidence que les concentrations mesurées sont plus élevées que dans l'air environnant ($p<0,001$). Cette expérience a été menée au moyen d'un appareil à impaction. Pourtant, la fixation des CIP sur la tête des chevaux à proximité des naseaux ne semble pas perturber la mesure de la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air. Ainsi nous n'avons pas mis en évidence la bactérie lors de l'expérience complémentaire au box alors qu'un poulain atteint de rhodococcose était présent.

La méthode mise au point permet de quantifier l'exposition à *Rhodococcus equi* virulent ou non virulent d'un cheval dans une surface déterminée que ce soit dans l'air total ou bien une de ses fractions. Aussi elle peut être utilisée pour d'autres applications. Ainsi, il est possible de quantifier la présence d'agents pathogènes bactériens ou bien d'endotoxines dans l'air. Il est donc envisageable de déterminer l'exposition d'autres chevaux à d'autres agents pathogènes que *Rhodococcus equi*. Le milieu de culture liquide utilisé peut être sélectif si besoin. De plus, il est bien sûr possible d'utiliser cette méthode en fixe, c'est-à-dire sans baudrier pour des situations réelles par exemple si une mesure en un point précis est demandée. Enfin, nous pouvons utiliser les techniques développées pour l'homme, notamment pour les intervenants de la filière équine même si *Rhodococcus equi* est une bactérie opportuniste qui n'affecte que les personnes immunodéprimées telles que les personnes atteintes de SIDA ou les transplantés. Cependant, il est tout à fait possible d'utiliser les CIP 10 M et ses déclinaisons pour quantifier l'exposition de l'homme à d'autres agents pathogènes dans le domaine de l'élevage équin ou autre. Enfin, l'utilisation des CIP 10 et de ses déclinaisons est intéressante pour quantifier l'exposition aux aérosols. Ainsi, il serait par exemple possible de déterminer et d'évaluer quantitativement les types de litières ou

Une fois le prélèvement terminé, nous avons choisi de mettre en culture un inoculum du liquide de prélèvement puis d'isoler les colonies de *Rhodococcus equi* avant de réaliser la PCR. Cette technique, certes fastidieuse nous a permis de constituer une souchothèque. Ainsi, à tout moment il est possible réaliser un antibiogramme ou bien de travailler sur la virulence de chaque souche. La mesure quantitative de la concentration en *Rhodococcus equi* relève de l'estimation du nombre de bactéries présent dans la solution BHI à la fin de la collecte. Aussi une technique quantitative de PCR en temps réel a été proposée (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2006). Cette technique se révèle spécifique et sensible dans la détection des *Rhodococcus equi* virulent possédant vap A. Cependant, le procédé d'extraction de l'ADN utilisé limite le seuil de détection à 100 UFC/ml ce qui est trop élevé pour détecter *Rhodococcus equi* dans l'air. De plus, les données

d'aliments susceptibles d'être les plus adaptés pour les chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (COPD). De même, ces mesures peuvent permettre d'étudier chez l'homme les conditions idéales de préparations d'une litière afin de réduire l'exposition des travailleurs aux aérosols.

Rhodococcus equi est une bactérie ubiquiste. De plus, des souches virulentes sont isolées dans le sol quel que soit le statut du haras (Martens *et al.*, 2002a). Cependant des mesures ont été préconisées pour assainir l'environnement du poulain et prévenir ainsi la rhodococcose (Ferry et Baradeau, 2010). Dans les écuries, il est conseillé un nettoyage à haute pression des sols et des murs puis une destruction de *Rhodococcus equi* par des désinfectants à base d'ammoniums quaternaires et de dérivés phénoliques. Une bonne ventilation des locaux est également préconisée. Dans les herbages, une gestion des troupeaux en pâturage tournant doit être mise en place pour éviter le surpâturage. Le déplacement périodique des bacs à eau et des auges peut également éviter que les poulains ne restent au même endroit dans l'herbage favorisant ainsi la formation de zones poussiéreuses. Ces zones poussiéreuses peuvent d'ailleurs être arrosées. En outre le ramassage des crottins peut être automatisé et leur étalement doit être proscrit. Il est conseillé d'affecter aux juments non suitées les parcelles restant contaminées après ces traitements. Éventuellement, les zones contaminées peuvent être décaissées mais ces travaux sont coûteux. Un labour profond avec semis de pâture est envisageable. Des bons résultats ont été obtenus dès un mois après le chaulage des parcelles contaminées. L'épandage de la chaux en poudre doit être fait sur sol humide afin de profiter de l'élévation de température lors de la dissolution (Ferry et Baradeau, 2010). Cependant, ces traitements doivent impérativement être alliés à la réduction des facteurs de risque. Ces facteurs de risque sont nombreux (Tapprest *et al.*, 2012). Une partie d'entre eux a été mis en évidence dans le haras H2 dans notre étude.

3.8 PERSPECTIVES

Les méthodes développées et les résultats de cette première étude sont prometteurs. Une prochaine enquête à plus grande échelle, regroupant un plus grand nombre de haras sains ainsi que de haras « atteints » permettra de préciser nos observations. Sur la base des résultats obtenus dans notre étude, l'enquête à plus grande échelle comprendra un protocole réduit avec principalement la détermination de la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air total sur les différentes surfaces du haras ainsi que des prélèvements de sol aux faibles profondeurs. Nous avons montré dans notre étude que les différentes concentrations en *Rhodococcus equi* varient au cours du temps mais aussi selon les conditions climatiques dans un même élevage. Une météorologie favorable apparaît comme une condition indispensable pour pouvoir effectuer un prélèvement de qualité. La difficulté de cette enquête résidera donc dans la possibilité de réaliser l'ensemble des prélèvements dans une période de temps restreinte tout en profitant des conditions météorologiques stables et favorables afin d'établir une comparaison valable entre les élevages. À terme, il serait peut-être envisageable de déterminer le risque qu'encourt un poulain lors de son arrivée dans un élevage. Enfin, ces méthodes pourraient permettre de suivre de manière quantitative les concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'environnement des élevages. Ainsi dans le cadre d'une activité de conseil, elles permettraient de suivre l'efficacité des mesures de prévention ou des traitements des surfaces mis en place dans les haras contaminés.

Il n'est probablement pas possible d'établir un modèle épidémiologique pour *Rhodococcus equi*. En effet, il s'agit d'une bactérie ubiquiste et opportuniste pouvant affecter des espèces différentes. Pourtant, il est permis de penser que la quantité de *Rhodococcus equi* dans l'air est fonction de sa présence dans le sol et de sa capacité à être aérosolisée. La présence de *Rhodococcus equi* dans le sol est probablement déterminée par de nombreux facteurs déjà mis en évidence (Tapprest *et al.*, 2012) ainsi que des paramètres climatiques. La quantité de *Rhodococcus equi* dans l'air est fonction de la présence de la bactérie dans le sol ainsi que de paramètres pouvant influer sur son aérosolisation tels que les caractéristiques du sol, la conduite d'élevage ou les conditions climatiques. La mesure de la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air permet d'évaluer son exposition. Cependant, la probabilité d'inhalation d'aérosols connaît une variabilité interindividuelle. De plus, la probabilité d'infection est également fonction de l'état du système immunitaire de chaque individu.

CONCLUSION

La phase de recherche et développement a permis de comparer les différentes techniques de mesure de la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air. Une technique de mesure de la concentration pondérale en aérosols a permis d'étudier de manière inédite la relation avec la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air.

La technique mise au point est innovante puisqu'elle permet d'obtenir une mesure embarquée fiable de la concentration en *Rhodococcus equi* virulent ou non grâce à une technique de prélèvement par impingement. Cette mesure est révélatrice de l'exposition réelle d'un cheval dans la surface sur laquelle il évolue. Enfin, cette méthode permet une quantification dans l'air total ou bien ses différentes fractions telles que fraction alvéolaire, thoracique ou inhalable. Sa mise en œuvre dans les élevages n'a pas présenté d'obstacles et a été bien accueillie.

La construction d'une étude avec plusieurs séances de prélèvements de terre, d'air et de fèces sur différentes surfaces d'un haras sain et d'un haras contaminé nous a permis d'étudier les relations entre les paramètres mesurés. Ainsi, notre étude a révélé que le haras contaminé possède certains facteurs de risque connus tels qu'une grande densité de juments et de poulains, la présence d'une barre de contention dédiée à la gynécologie ou encore des naissances tardives. Nous avons montré que *Rhodococcus equi* virulent est présent dans le sol des deux haras. *Rhodococcus equi* est davantage retrouvé dans les fèces des juments et des poulains du haras contaminé que ceux du haras sain (p bilatéral $<0,0017$). En ce qui concerne les prélèvements de terre, *Rhodococcus equi* est davantage présent dans le sol du haras contaminé que le haras sain, qu'il soit virulent ($p<0,00018$) ou bien total ($p<0,00093$). Nous avons également montré que *Rhodococcus equi* se concentre davantage aux faibles profondeurs (surface et 5 cm) qu'aux profondeurs plus importantes (20 et 50 cm) et ce qu'il soit virulent ($p<0,00065$) ou total ($p<0,0013$). Pour ce qui est de la comparaison selon chaque surface, *Rhodococcus equi* n'est pas plus fréquemment isolé dans le sol du paddock que celui du champ. Cependant, il semble que la bactérie soit en concentration plus importante dans le sol des paddocks que des champs. De plus, nous avons montré que la présence de *Rhodococcus equi* virulent se concentre essentiellement à l'entrée du champ et du paddock localisé dans les surfaces du haras sain (entrées) alors qu'il est retrouvé dans toutes les localisations (entrées, auges, centres) du champ et du paddock dans le haras «malade». Enfin, des facteurs communs semblent être à l'origine de l'évolution similaire de la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol au cours du temps, mais nous n'avons pas trouvé de corrélation avec un facteur climatique. Nous avons montré que *Rhodococcus equi* virulent est présent dans l'air du haras contaminé alors qu'il est absent dans celui du haras sain ($p<0,013$). C'est un paramètre essentiel qui distingue les deux haras. *Rhodococcus equi* n'est pas plus fréquemment retrouvé dans l'air du paddock que celui du champ même si les concentrations mesurées dans l'air des paddocks sont supérieures aux concentrations mesurées dans l'air des champs. Il n'a jamais été retrouvé dans l'air d'un box. Cependant, les concentrations moyennes en *Rhodococcus equi* total sont différentes que ce soit pour le haras sain (58,68 au

paddock contre 7,89 UFC/m³ d'air dans le champ) ou pour le haras contaminé (142,94 au paddock contre 40,0 UFC/m³ d'air dans le champ). Enfin, nous n'avons pas réussi à montrer statistiquement qu'il existe une corrélation entre la concentration pondérale en aérosols et la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air, probablement en raison de la trop faible taille de nos effectifs.

Avec ces techniques développées, la réalisation d'une étude avec un plus grand nombre de haras sains ou atteints de manière sporadique ou enzootique permettra à l'avenir de préciser les relations observées.

ANNEXES

Annexe n° 1: Composition du milieu Brain Heart Infusion (Bouillon cœur-cervelle)

Le remplacement des extraits de viande par des extraits de cervelle de veau et cœur de bœuf fait la spécificité de ce bouillon. C'est un excellent milieu d'hémoculture qui convient à la plupart des bactéries aérobies. Il est composé de :

- Infusion de cervelle de veau (Source d'azote)
- Infusion de cœur de bœuf (Source d'azote)
- Peptone de gélatine (Source d'azote)
- Chlorure de sodium (participe à la pression osmotique)
- Phosphate disodique (permet un bon fonctionnement de l'enzyme)
- Glucose (Source de carbone)
- Eau

Annexe n° 2: Composition de la gélose ANC columbia avec 5% de sang de mouton, milieu sélectif des bactéries gram positives.

Il s'agit d'un milieu sélectif des bactéries GRAM + composé de :

- Mélange spécial de peptones 23,0 g
- Amidon 1,0 g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- Agar 10,0 g
- Sang de mouton 50,0 ml
- Acide nalidixique 15,0 mg
- Colimycine 15,0 mg

Annexe n° 3: Loi de Feller (extrait du manuel d'utilisation de l'Air idéal® 3P page 7-2)

La formule de la loi de Feller est la suivante :

$$NPP = N \cdot (1/N + 1/(N-1) + 1/(N-2) + \dots + 1/(N-UFC+1))$$

Où :

NPP= nombre total le plus probable de germes ayant traversé les orifices du crible

N= nombre d'orifice du crible

UFC= unité formant colonie, valeur lue au laboratoire

Dans le cas d'un crible pour lequel le passage d'une particule à travers un orifice donné du crible est purement aléatoire, il existe une probabilité pour que, au cours du prélèvement, plusieurs particules traversent un même orifice et ne soient de fait comptabilisées comme une seule et unique particule UFC, alors que par ailleurs d'autres orifices ne seront traversés par aucune particule.

Plus la valeur UFC comptabilisée au laboratoire est proche de N (nombre total d'orifice du crible), plus cette probabilité augmente. L'application de la loi de Feller est donc particulièrement pertinente lorsqu'on lit des valeurs UFC élevées, c'est à dire dans le cas de géloses proches de la saturation en colonies.

Annexe n° 4: Composition de l' Argospray®

L' Argospray® utilisée est un bactéricide en 5 minutes (EN 1040, NF T72-190)

- Guanidium acétate
- Propionate d'ammonium quaternaire
- N-propanol
- Tensio-actif non ionique
- Parfum, excipients

Annexe n° 5: Dénombrement des colonies (extrait de la norme NF EN 13098 :2000-12)

Formules de calcul des UFC à partir des suspensions liquides obtenues par des échantillonneurs à « impingement » ou des échantillonneurs à filtre.

$$C = \frac{\sum C \times V_0}{V_1 (n_1 + 0,1 \times n_2) d \times V_a}$$

Où :

C est la concentration, en UFC/m³ d'air

d est le facteur de dilution à partir duquel la première dilution dénombrable a été obtenue

n_1 est le nombre de plaques identiques dans la première dilution dénombrables, c'est-à-dire avec le nombre de colonies le plus élevé

n_2 est le nombre de plaques identiques dans la deuxième dilution dénombrables, c'est-à-dire avec le nombre de colonies le plus faible

V_0 est le volume total de suspension liquide, en ml

V_1 est le volume de l'inoculum appliqué à chaque plaque de gélose, en ml

V_a est le volume total d'air prélevé, calculé à partir du taux d'échantillonnage et du temps d'échantillonnage, en mètres cubes

$\sum C$ est la somme de colonies sur toutes les plaques dénombrées, en nombre d'unité formant colonie

*Annexe n° 6: Modèle du formulaire utilisé pour noter les résultat pour chaque prélèvement.
Données pour le haras H2 le 19/05/2011*

Date : 19/05/2011 H2 Précipitations cumulées depuis la dernière mesure : 1,4 mm

Paddock

Conditions climatiques : Sec, couvert vent : 0,4 m/s T= 18,6 °C H= 56,6 %

Heure de début : 10h10 Heure de fin : 11h40

Surface en terre : m² soit %

Surface en herbe : m² soit %

Impression visuelle du niveau de poussières: B-

A : non poussiéreux

B : poussières visibles

Effectifs (charge) : 1 suite

C : très poussiéreux

Box

Conditions climatiques : Sec vent : 0m/s T= 20,4 °C H= 64,5 %

Heure de début : 12h00 Heure de fin : 13h30

Champ

Conditions climatiques : Sec vent : 0,3 m/s T= 20,4 °C H= 48,6 %

Surface en terre : m² soit %

Surface en herbe : m² soit %

Impression visuelle du niveau de poussières: B- A : non poussiéreux

B : poussières visibles

Effectifs (charge) : 1 suiteé C : très poussiéreux

CONCENTRATION DE *RHODOCOCCUS EQUI* EN AEROSOLS

	Paddock			Box			Champ		
	Totales		Alvéolaires	Totales		Alvéolaires	Totales		Alvéolaires
Temps de prélevement (min)	90		90	90		90	90		90
Volume solution récupéré (ml)	0,6		1,0	0,9		1,0	1,1		1,1

Nombre de Colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (UFC)		Paddock						Box						Champ					
		Totales			Alvéolaires			Totales			Alvéolaires			Totales			Alvéolaires		
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^0	P-	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
	P+	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
10^{-1}	P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{-2}	P-	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

P+ → souches avec le plasmide de virulence vap A

P- → souches sans le plasmide de virulence vap A

CONCENTRATION EN *RHODOCOCCUS EQUI* DANS LE SOL

			Paddock			Champ		
			Entrée	Abreuvoir / Auge	Centre	Entrée	Abreuvoir / Auge	Centre
Nombre de Colonies de <i>Rhodococcus equi</i> (UFC)	Surfac e	P+	0	0	0	2	0	0
		P -	1	1	0	2	0	1
	5 cm	P+	0	0	0	0	0	0
		P -	1	0	1	2	0	4
	20 cm	P+	0	0	0	0	0	0
		P -	0	1	3	1	0	0
	50 cm	P+	0	0	0	0	0	0
		P -	0	1	0	0	0	0

Chiffonette « allée » = Pas de *R.equi*

Chiffonette « Box » = Pas de *R.equi*

Chiffonette « Entrée du box de gynécologie » = 1 souche P -

- P+ → souches avec le plasmide de virulence vap A
- P- → souches sans le plasmide de virulence vap A

EXPRESSION DES RESULTATS

Concentration R_{equi} (Champs, H1, 5cm)= $4.10^2 \times R_{equi}/g$ de terre

			Paddock			Champ		
			Entrée	Abreuvoir / Auge	Centre	Entrée	Abreuvoir / Auge	Centre
Concentration de <i>Rhodococcus equi</i> dans le sol <i>Rhodococcus equi/g de fèces</i>	Surfac e	P+	0	0	0	8.10²	0	0
		P -	4.10²	4.10²	0	8.10²	0	4.10²
	5 cm	P+	0	0	0	0	0	0
		P -	4.10²	0	4.10²	8.10²	0	1,6.10³
	20 cm	P+	0	0	0	0	0	0
		P -	0	4.10²	1,2.10³	4.10²	0	0
	50 cm	P+	0	0	0	0	0	0
		P -	0	4.10²	0	0	0	0

CONCENTRATION PONDERALE D'UN AEROSOL SUR MOUSSE TOURNANTE

Conformité de la phase de préparation 1

OUI

NON

Pesée avant prélèvement

Date : 18/05/11 Heure : 8h25 T° (salle) : 16,1°C H°(salle) : 59,9%

N°coupelle	8	11	9	12	10	15	6	7	13
Masse (g)	5,7518	5,7583	6,0634	5,7577	5,7727	5,7539	5,7539	5,7578	5,7948

Conformité de la phase de préparation 2

OUI

NON

Pesée après prélèvement

Date : 23/05/11 Heure : 10h00 T° (salle) : 19,8 °C H°(salle) : 43,6 %

N°coupelle	8	11	9	12	10	15	6	7	13
Masse (g)	5,7825	5,7592	6,0746	5,7590	5,7848	5,7547	5,7551	5,7590	5,7961

Annexe n° 7: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour la quantification des aérosols dans le haras H1

		Haras 1											
		Paddock	Box	Champ	Témoin haras	Témoin haras	Témoin haras	Témoin salle de pesée	Témoin salle de pesée	Dates des pesées	Hygrométrie salle de pesée (%)	Température salle de pesée (C°)	Fraction air
Numéro coupelle		1	2	3	4	5	14	6	7	13			
Prélèvement du 07/04/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7575	5,7605	5,7596	5,7605	5,7810		5,7515		5,8008	07/04/2011	50	19,1
	Masse après prélèvement (g)	5,7578	5,7611	5,7603	5,7616	5,7823		5,7522		5,8009	11/04/2011	57,7	18,6 °C
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	105									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	1,05									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières alvéolaires/m³ d'air	-0,000556	-0,000222	-9,52E-05									
Prélèvement du 20/04/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7589	5,7588	5,7600	5,7603	5,7795		5,7587		5,7947	20/04/2011	49,5	19,3°C
	Masse après prélèvement (g)	5,7591	5,7592	5,7611	5,7610	5,7800		5,7593		5,7945	23/04/2011	50,3	20,4°C
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	90									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	0,9									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières alvéolaires/m³ d'air	-0,000222	-2,47E-16	0,0007778									
Prélèvement du 9/05/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7545	6,0634	5,7642	5,7713	5,7634	5,7607	5,7543	5,7533	5,7908	06/05/2011	52,2	16,9
	Masse après prélèvement (g)	5,7767	6,0728	5,7694	5,7726	5,7642	5,7614	5,7553	5,7545	5,7918	12/05/2011	44	20,5
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	110									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	1,1									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières totales/m³ d'air	0,0235556	0,0093333	0,0038182									
Prélèvement du 18/05/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7548	5,7575	5,7633	5,7564	5,7824	5,7555	5,7539	5,7578	5,7948	18/05/2011	59,9	16,1
	Masse après prélèvement (g)	5,7730	5,7641	5,7678	5,7574	5,7828	5,7560	5,7551	5,7590	5,7961	23/02/2011	43,6	19,8
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	95									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	0,95									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières totales/m³ d'air	0,0191852	0,0062963	0,0037544									
Prélèvement du 30/05/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7546	5,7568	5,7557	5,7600	5,7799	5,7590	5,7583	5,7540	5,8007	30/05/2011	61,2	17,7
	Masse après prélèvement (g)	5,7862	5,7591	5,7578	5,7606	5,7807	5,7601	5,7591	5,7547	5,8015	06/06/2011	65,3	19,3
	Temps de prélèvement (minutes)	95	90	95									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,95	0,9	0,95									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières totales/m³ d'air	0,0324211	0,0016667	0,0013684									
Prélèvement du 16/06/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7550	5,7566	5,7665	5,7575	5,7817	5,7582	5,7566	5,7547	5,7923	15/06/2011	65,5	20,4
	Masse après prélèvement (g)	5,7563	5,7593	5,7682	5,7581	5,7822	5,7588	5,7574	5,7557	5,7934	20/06/2011	68,2	19,5
	Temps de prélèvement (minutes)	90	115	100									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	1,15	1									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières totales/m³ d'air	0,0005926	0,0016812	0,0009333									

Annexe n° 8: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour la quantification des aérosols dans le haras H2

		Paddock	Box	Champ	Témoin haras	Témoin haras	Témoin salle de pesée	Témoin salle de pesée	Dates des pesées	Hygrométrie salle de pesée (%)	Température salle de pesée (C°)	Fraction air	
	Numéro coupelle	8	9	10	11	12	15	6	7	13			
Prélèvement du 08/04/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7530	6,0752	5,7744	5,7638	5,7641		5,7515		5,8008	07/04/2011	50	19,1
	Masse après prélèvement (g)	5,7533	6,0739	5,7727	5,7641	5,7645		5,7522		5,8009	11/04/2011	57,7	18,6
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	90									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	0,9									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières alvéolaires/m³ d'air	-8,33E-05	-0,001861	-0,002306									
Prélèvement du 21/04/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7493	6,0710	5,7726	5,7559	5,7695		5,7587		5,7947	20/04/2011	49,5	19,3
	Masse après prélèvement (g)	5,7558	6,0702	5,7625	5,7562	5,7700		5,7593		5,7945	23/04/2011	50,3	20,4
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	95									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	0,95									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières alvéolaires/m³ d'air	0,0068889	-0,001222	-0,010947									
Prélèvement du 06/05/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7572	5,7531	5,7608	5,7558	5,7762	5,7632	5,7543	5,7533	5,7908	06/05/2011	52,2	16,9
	Masse après prélèvement (g)	5,7912	5,7680	5,7716	5,7572	5,7773	5,7635	5,7553	5,7545	5,7918	12/05/2011	44	20,5
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	90									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	0,9									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières totales/m³ d'air	0,0366667	0,0154444	0,0108889									
Prélèvement du 19/05/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7518	6,0634	5,7727	5,7583	5,7577	5,7539	5,7539	5,7578	5,7948	18/05/2011	59,9	16,1
	Masse après prélèvement (g)	5,7825	6,0746	5,7848	5,7592	5,7590	5,7547	5,7551	5,7590	5,7961	23/05/2011	43,6	19,1
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	90									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	0,9									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières totales/m³ d'air	0,0328704	0,0112037	0,0122037									
Prélèvement du 01/06/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7579	6,0705	5,7768	5,7642	5,7718	5,7619	5,7583	5,7540	5,8007	30/05/2011	61,2	17,7
	Masse après prélèvement (g)	5,7940	6,0739	5,8109	5,7651	5,7730	5,7634	5,7591	5,7547	5,8015	06/06/2011	65,3	19,3
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	90									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	0,9									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières totales/m³ d'air	0,0390185	0,0026852	0,0367963									
Prélèvement du 17/06/2011	Masse avant prélèvement (g)	5,7537	6,0674	5,7943	5,7596	5,7622	5,7635	5,7566	5,7547	5,7923	15/06/2011	65,5	20,4
	Masse après prélèvement (g)	5,7549	6,0733	5,7962	5,7606	5,7629	5,7644	5,7574	5,7557	5,7934	20/06/2011	68,2	19,5
	Temps de prélèvement (minutes)	90	90	90									
	Volume d'air prélevé (m³)	0,9	0,9	0,9									
	Concentration pondérale de l'aérosol en g de poussières totales/m³ d'air	0,0003148	0,005537	0,0010926									

Air alvéolaire

Air total

Annexe n° 9: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour la quantification de Rhodococcus equi dans l'air dans le haras HI

Haras 1															
		Surface			Paddock			Box			Champ				
		CIP			Total			Alvéolaire			Alvéolaire				
Dilutions		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ⁻¹		
Boîtes	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Volume de liquide récupéré dans le CIP 10MR															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans le CIP 10MR															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														
Concentration en UFC/m ³ d'air	P+														
	P-														
Volume de liquide récupéré dans les CIP (mL)															
Temps de prélevement (minutes)															
Volume d'air prélevé (m ³)															
Nombre de colonies	P+														
	P-														

Annexe n° 10: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour la quantification de Rhodococcus equi dans l'air dans le haras H2

Annexe n° 11: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les données climatologiques et relevé des conditions expérimentales dans le haras H1

Haras 1			
Surface	Paddock	Box	Champ
Précipitation cumulées (mm) du 25/03/11 au 07/04/11		17,8	
07/04/2011	Température °C	22,5	26,5
	Température M. sous abri	13,3	
	Hygrométrie %	42	25
	Temps sec ou pluvieux	Sec	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	1,8	1,1
	Surface en herbe m²	1799 (97%)	28 652 (95,5%)
	Surface en terre m²	56 (3%)	1 348 (4,5%)
	Impression visuelle	A	Correctement paillé, présence de crottin, Foin à disposition.
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	4 juments et leurs poulains
Précipitation cumulées (mm) du 08/04/11 au 20/04/11		0,6	
20/04/2011	Température °C	24,1	25,5
	Température M. sous abri	17,5	
	Hygrométrie %	25	32
	Temps sec ou pluvieux	Sec	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	0,9	1,8
	Surface en herbe m²	1797 (96,8%)	28 652 (95,5%)
	Surface en terre m²	58 (3,2%)	1 348 (4,5%)
	Impression visuelle	A	Box spacieux pour poulinage correctement paillé, foin à disposition
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	2 juments et leurs poulains
Précipitation cumulées (mm) du 21/04/11 au 09/05/11		22,8	
09/05/2011	Température °C	19,9	24,8
	Température M. sous abri	13,8	
	Hygrométrie %	53	40,1
	Temps sec ou pluvieux	Sec, couvert,	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	0	0,7
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	A	Box normal, fraîchement paillé, foin à disposition
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	2 juments et leurs poulains
Précipitation cumulées (mm) du 10/05/11 au 18/05/11		1,2	
18/05/2011	Température °C	19,1	28,7
	Température M. sous abri	13,2	
	Hygrométrie %	49,5	35
	Temps sec ou pluvieux	Sec	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	1,8	1,8
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	A	Box normal, fraîchement paillé, foin à disposition
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	2 juments et leurs poulains
Précipitation cumulées (mm) du 19/05/11 au 30/05/11		5,8	
30/05/2011	Température °C	25,5	22,8
	Température M. sous abri	13,7	
	Hygrométrie %	41,4	65
	Temps sec ou pluvieux	Pluvieux	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	1,4	0,2
	Vent (m/s)	0,7	0,3
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	A	Box normal avec des crottins, foin à disposition
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	4 juments et leurs poulains
Précipitation cumulées (mm) du 31/05/11 au 01/06/11		52,8	
16/06/2011	Température °C	17,8	20,6
	Température M. sous abri	14,1	
	Hygrométrie %	70,5	45,5
	Temps sec ou pluvieux	Pluvieux	Pluvieux
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0,2	0,2
	Vent (m/s)	2,9	2,8
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	A	Box normal avec des crottins, foin à disposition
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	4 juments et leurs poulains

Annexe n° 12: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les données climatologiques et relevé des conditions expérimentales dans le haras H2

Haras 2			
Surface	Paddock	Box	Champ
Précipitation cumulées (mm) du 26/34/11 au 08/04/11		21,1	
08/04/2011	Température °C	22,2	23,2
	Température M. sous abri		12,4
	Hygrométrie %	41	53
	Temps sec ou pluvieux	Sec	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	0,8	1,7
	Surface en herbe m²	4 260 (95%)	52 427 (99%)
	Surface en terre m²	240 (5%)	573 (1%)
	Impression visuelle	A	A
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	7 juments et leurs poulains
Précipitation cumulées (mm) du 09/04/11 au 21/04/11		0,4	
21/04/2011	Température °C	21,4	23,5
	Température M. sous abri		17,1
	Hygrométrie %	43,7	55
	Temps sec ou pluvieux	Sec	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	1,5	2,6
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	A	Box paillé, jument restant au box pour cause de blessure
	Effectifs (charge)	1 jument	1 jument et son poulain
Précipitation cumulées (mm) du 22/04/11 au 06/05/11		10,8	
06/05/2011	Température °C	21,7	28,4
	Température M. sous abri		18,6
	Hygrométrie %	42,4	42,8
	Temps sec ou pluvieux	Sec	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	1,4	1,7
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	B	Box correctement paillé, Foin à disposition
	Effectifs (charge)	2 juments et leurs poulains	1 jument et son poulain
Précipitation cumulées (mm) du 07/05/11 au 19/05/11		1,4	
19/05/2011	Température °C	18,6	20,4
	Température M. sous abri		13,2
	Hygrométrie %	56,6	64,5
	Temps sec ou pluvieux	Sec, couvert	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	0,4	0,3
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	B+	Box correctement paillé, Foin à disposition,Présence crottins
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	1 jument et son poulain
Précipitation cumulées (mm) du 20/05/11 au 01/06/11		6,8	
01/06/2011	Température °C	23,1	21
	Température M. sous abri		11,3
	Hygrométrie %	48,9	52
	Temps sec ou pluvieux	Sec	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0	0
	Vent (m/s)	0,1	4,2
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	B -	Box correctement paillé, présence de foin et de nombreux crottins
	Effectifs (charge)	1 jument (à terme)	1 jument et son poulain
Précipitation cumulées (mm) du 02/06/11 au 17/06/11		46,5	
17/06/2011	Température °C	17	15,8
	Température M. sous abri		12,7
	Hygrométrie %	78,6	78,1
	Temps sec ou pluvieux	Pluvieux	Sec
	Précipitations durant prélèvement (mm)	0,6	0,1
	Vent (m/s)	0,3	1,8
	Surface en herbe m²		
	Surface en terre m²		
	Impression visuelle	A	Box correctement paillé, présence de foin et de quelques crottins
	Effectifs (charge)	1 jument et son poulain	1 jument et son poulain

Annexe n° 13: Tableau Excel présentant les caractéristiques des chevaux pour lesquels les fèces ont été prélevés dans le haras H1

H1					
Code	Sexe	Date de naissance	Résidente	Résidente avec séjour à l'extérieure <i>(Angleterre ou Irlande. Départ 1 mois avant terme et retour à 42 jours après Diagnostic de gestation positif)</i>	Extérieure
H1-J1	F	1996	O		
H1-P1	M	19/03/2011	O		
H1-J2	F	2001	O		
H1-P2	F	25/01/2011	O		
H1-J3	F	2006	O		
H1-P3	F	08/04/2011	O		
H1-J4	F	20/06/2005	O		
H1-P4	F	15/04/2011	O		
H1-J5	F	17/02/2002		O	
H1-P5	M	11/02/2011		O	
H1-J6	F	2002	O		
H1-P6	M	10/02/2011	O		
H1-J7	F	1992	O		
H1-P7	F	07/02/2011	O		
H1-J8	F	2005	O		
H1-P8	F	16/03/2011	O		
H1-J9	F	2005		O	
H1-P9	F	10/02/2011		O	
H1-J10	F	11/04/2006		O	
H1-P10	F	31/01/2011		O	
H1-J11	F	2000		O	
H1-P11	F	07/03/2011		O	
H1-J12	F	18/05/2002		O	
H1-P12	M	06/03/2011		O	
H1-J13	F	1998		O	
H1-P13	M	17/02/2011		O	
H1-J14	F	2003		O	
H1-P14	M	03/03/2011		O	
H1-J15	F	18/03/1996		O	
H1-P15	M	18/03/2011		O	
H1-J16	F	01/03/2003		O	
H1-P16	M	12/02/2011		O	

Annexe n° 14: Tableau Excel présentant les caractéristiques des chevaux pour lesquels les fèces ont été prélevés dans le haras H2

H2						
Code	Sexe	Date de naissance	Résidente	Résidente avec séjour à l'extérieur	Extérieure	Date du diagnostic
H2-J1	F	-	O			
H2-P1	M	31/03/2011	O			
H2-J2	F	-	O			
H2-P2	M	31/03/2011	O			02/05/2011
H2-J3	F	-	O			
H2-P3	M	21/02/2011	O			
H2-J4	F	-	O			
H2-P4	F	07/03/2011	O			
H2-J5	F	-	O			
H2-P5	F	09/03/2011	O			
H2-J6	F	-			O	
H2-P6	M	26/03/2011			O	
H2-J7	F	-	O			
H2-P7	M	01/03/2011	O			
H2-J8	F	-	O			
H2-P8	M	19/01/2011	O			
H2-J9	F	-	O			
H2-P9	F	23/02/2011	O			
H2-J10	F	-	O			
H2-P10	F	26/03/2011	O			
H2-J11	F	-	O			
H2-P11	F	28/04/2011	O			09/06/2011
H2-J12	F	-	O			
H2-P12	M	04/04/2011	O			
H2-J13	F	-	O			
H2-P13	M	21/03/2011	O			28/05/2011
H2-J14	F	-	O			
H2-P14	M	09/03/2011	O			
H2-J15	F	-	O			
H2-P15	F	05/05/2011	O			
H2-J16	F	-	O			
H2-P16	M	23/04/2011	O			
H2-J17	F	-	O			
H2-P17	M	22/03/2011	O			
H2-J18	F	-	O			
H2-P18	M	05/05/2011	O			
H2-J19	F	-	O			
H2-P19	F	21/05/2011	O			04/07/2011
H2-J20	F	-			O	
H2-P20	F	27/03/2011			O	19/04/2011
H2-J21	F	-	O			
H2-P21	F	10/03/2011	O			

Annexe n° 15: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les prélèvements de fèces dans le haras H1

		Haras 1											
Prélèvements Fécès		07/04/2011		20/04/2011		09/05/2011		18/05/2011		30/06/2011		16/06/2011	
		Nombre de colonies de <i>R.equi</i>	Concentration en UFC/g	Nombre de colonies de <i>R.equi</i>	Concentration en UFC/g	Nombre de colonies de <i>R.equi</i>	Concentration en UFC/g	Nombre de colonies de <i>R.equi</i>	Concentration en UFC/g	Nombre de colonies de <i>R.equi</i>	Concentration en UFC/g	Nombre de colonies de <i>R.equi</i>	Concentration en UFC/g
H1-J1	P+	0	0										
	P-	0	0									0	0
H1-P1	P+											0	0
	P-											0	0
H1-J2	P+		0	0									
	P-		0	0									
H1-P2	P+							0	0				
	P-							0	0				
H1-J3	P+		0	0									
	P-		0	0									
H1-P3	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-J4	P+		0	0									
	P-		0	0								0	0
H1-P4	P+											0	0
	P-											0	0
H1-J5	P+		0	0									
	P-		0	0									
H1-P5	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-J6	P+		0	0									
	P-		0	0									
H1-P6	P+							0	0				
	P-							0	0				
H1-J7	P+		0	0									
	P-		0	0									
H1-P7	P+				0	0							
	P-				0	0							
H1-J8	P+		0	0									
	P-		0	0									
H1-P8	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-J9	P+						0	0					
	P-						0	0					
H1-P9	P+							0	0				
	P-							0	0				
H1-J10	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-P10	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-J11	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-P11	P+											0	0
	P-											0	0
H1-J12	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-P12	P+											0	0
	P-											0	0
H1-J13	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-P13	P+											0	0
	P-											0	0
H1-J14	P+											0	0
	P-											0	0
H1-P14	P+											0	0
	P-											0	0
H1-J15	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-P15	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-J16	P+									0	0		
	P-									0	0		
H1-P16	P+									0	0		
	P-									0	0		

Annexe n° 16: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les prélèvements de fèces dans le haras H2

Prélèvements Féces	Haras 2											
	08/04/2011		21/04/2011		06/05/2011		19/05/2011		01/06/2011		17/06/2011	
	Nombre de	Concentration en UFC/g		Nombre de	Concentration en UFC/g		Nombre de	Concentration en UFC/g		Nombre de	Concentration en UFC/g	
H2-J1	P+	0	0									
	P-	1	400									
H2-P1	P+							0	0			
	P-							0	0			
H2-J2	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P2	P+							0	0			
	P-							0	0			
H2-J3	P+	1	400									
	P-	0	0									
H2-P3	P+					1	400					
	P-					0	0					
H2-J4	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P4	P+							0	0			
	P-							0	0			
H2-J5	P+	1	400									
	P-	0	0									
H2-P5	P+					0	0					
	P-					0	0					
H2-J6	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P6	P+										0	0
	P-										0	0
H2-J7	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P7	P+										0	0
	P-										0	0
H2-J8	P+	1	400									
	P-	0	0									
H2-P8	P+										0	0
	P-										0	0
H2-J9	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P9	P+			0	0							
	P-			0	0							
H2-J10	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P10	P+						2	800				
	P-						7	2800				
H2-J11	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P11	P+										0	0
	P-										0	0
H2-J12	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P12	P+		1	400								
	P-		0	0								
H2-J13	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P13	P+				16	6400						
	P-				4	1600						
H2-J14	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P14	P+		0	0								
	P-		0	0								
H2-J15	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P15	P+										1	400
	P-										0	0
H2-J16	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P16	P+										0	0
	P-										0	0
H2-J17	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P17	P+		0	0								
	P-		1	400								
H2-J18	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P18	P+										3	1200
	P-										1	400
H2-J19	P+	0	0									
	P-	0	0									
H2-P19	P+										0	0
	P-										0	0
H2-J20	P+										0	0
	P-										0	0
H2-P20	P+							0	0			
	P-							0	0			
H2-J21	P+	0	0					0	0			
	P-	0	0					0	0			
H2-P21	P+							0	0			
	P-							0	0			

Annexe n° 17: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les prélèvements de terre dans le haras H1

		Haras 1												
Prélèvements Terre		P+/ P-	07/04/2011		20/04/2011		09/05/2011		18/05/2011		30/05/2011		16/06/2011	
			Nombre de colonies	Concentration en UFC/g										
Paddock	Entrée	Surface	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	2	800	0	0	2	800	1	400	1
		5cm	P+	1	400	0	0	2	800	0	0	2	800	0
			P-	5	2000	6	2400	3	1200	2	800	3	1200	4
		20 cm	P+	2	800	0	0	0	0	0	0	2	800	0
			P-	0	0	2	800	0	0	2	800	3	1200	0
		50 cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pierre à Sel	Surface	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1200	0
		20 cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	3	1200	1	400	1	400	0	0	0
	Centre	Surface	P+	0	0	0	0	1	400	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	0	0	0	1	400	1	400
		5cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	4	1600	0	0	0	0	0	0	0
		20 cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1600	0
	Champ	50 cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Surface	P+	0	0	0	0	1	400	0	0	0	0	0
			P-	1	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5cm	P+	0	0	0	0	1	400	1	400	0	0	0
			P-	2	800	1	400	0	0	0	0	1	400	0
	Abreuvoir	20 cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	2	800	1	400	1	400	1	400	1	400	0
		50 cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	1	400	1	400	1	400	0	0	0
		Surface	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	1	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Centre	5cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	1	400	6	2400	0	0	1	400	2	800	0
		20 cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	1	400	0	0	0	0	0	0	0
		50 cm	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	1	400	0	0	0	0	0
Lingette	Box	10 µl	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100 µl	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Allée	10 µl	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100 µl	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexe n° 18: Tableau Excel présentant les résultats obtenus pour les prélèvements de terre dans le haras H2

Prélèvements Terre		P+/ P-	Haras 2												
			08/04/2011		21/04/2011		06/05/2011		19/05/2011		01/06/2011		17/06/2011		
			Nombre de	Concentration en UFC/g	Nombre de colonies	Concentration en UFC/g									
Entrée	Surface	P+	0	0	3	1200	0	0	0	0	2	800	0	0	
		P-	0	0	6	2400	2	800	1	400	0	0	0	0	
		P+	0	0	1	400	0	0	0	0	2	800	1	400	
	5cm	P-	0	0	5	2000	2	800	1	400	7	2800	4	1600	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	400	
		P-	0	0	0	0	2	800	0	0	0	0	3	1200	
Paddock	Abreuvoir	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P+	0	0	4	1600	0	0	0	0	2	800	2	800	
	20 cm	P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	400	2	800	
		P-	4	1600	0	0	1	400	1	400	2	800	0	0	
Centre	Surface	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	2	800	1	400	0	0	0	0	1	400	
		P+	0	0	1	400	1	400	0	0	1	400	7	2800	
	5cm	P-	0	0	3	1200	1	400	1	400	0	0	1	400	
		P+	1	400	0	0	0	0	0	0	0	0	1	400	
		P-	0	0	1	400	1	400	3	1200	0	0	1	400	
Champ	Abreuvoir	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	20 cm	P-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	400	0	0	
		P+	0	0	1	400	0	0	0	1	400	0	0	1	400
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lingette	Centre	Surface	P+	0	0	2	800	0	0	0	0	0	0	1	400
		P-	1	400	4	1600	0	0	1	400	0	0	0	0	0
		P+	1	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5cm	P-	0	0	6	2400	0	0	4	1600	2	800	0	0	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	1	400	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lingette	Box	Surface	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100 µl	P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lingette	Devant box gynéco	Surface	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P+	0	0	1	400	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100 µl	P-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lingette	Allée	Surface	P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100 µl	P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		P-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Annexe n° 19: Tableau Excel présentant la liste des souches de *Rhodococcus equi* isolées pendant la campagne de prélèvement (partie 1)

Listing souches R. equi			Plasmide P+ / P-	Date PCR
Souches de <i>R. equi</i> Haras 1 7/04/11	H1-1 à H1-6	Paddock entrée 5 cm	1 P+ ; 5 P-	PCR réalisée le 3/05/11
	H1-7 et H1-8	Paddock entrée 20 cm	2 P+	
	H1-9 et H1-10	Champ entrée 5 cm	2P-	
	H1-11 et H1-12	Champ entrée 20 cm	2P-	
	H1-13 à H1-15	Champ milieu 50 cm	3P-	
	H1-16	Champ abreuvoir 5 cm	P-	
	H1-17	Champs abreuvoir surface		
	H1-42	Champ entrée surface	P-	
Souches de <i>R. equi</i> Haras 2 8/04/11	H2-18 et H2-19	Paddock entrée 50 cm	2P-	PCR réalisée le 3/05/11
	H2-20	Paddock milieu 20 cm	P+	
	H2-21	Paddock milieu 50 cm	P-	
	H2-22	Paddock abreuvoir surface	P-	
	H2-23	Paddock abreuvoir 5 cm	P+	
	H2-24 à H2-27	Paddock abreuvoir 20 cm	4P-	
	H2-28 et H2-29	Paddock abreuvoir 50 cm	2P-	
	H2-30	Champ entrée surface	P+	
	H2-31	Champ entrée 5 cm	P+	
	H2-32	Champ entrée 50 cm	P+	
	H2-33	Champ milieu surface	P-	
	H2-34	Champ milieu 5 cm	P+	
	H2-35	Fèces H2-J1	P-	
	H2-36	Fèces H2-J3	P+	
	H2-37	Fèces H2-JNS1	P-	
	H2-38	Fèces H2-JNS2	P-	
	H2-39	Fèces H2-JNS3	P-	
Souches de <i>R. equi</i> Haras 1 20/04/11	H2-40	Fèces H2-J5	P+	PCR réalisée le 16/05/11
	H2-41	Fèces H2-J8	P+	
	H1-43 à H1- 45	Champ milieu 5 cm	3P-	
	H1-46	Champ entrée 5 cm	P-	
	H1-47	Champ entrée 20 cm	P-	
	H1-48	Champ entrée 50 cm	P-	
	H1-49 à H1- 54	Champ abreuvoir 5 cm	6P-	
	H1-55	Champ abreuvoir 20 cm	P-	
	H1-56 à H1-58	Paddock sel 20 cm	3P-	
	H1-59 à H1-75	Paddock sel 50 cm	17P-	
	H1-76 à H1-79	Paddock milieu 5 cm	4P-	
	H1-80 et H1-81	Paddock entrée surface	2P-	
Souches de <i>R. equi</i> Haras 2 21/04/11	H1-82 à H1-87	Paddock entrée 5 cm	6P-	PCR réalisée le 16/05/11
	H1-88 et H1-89	Paddock entrée 20 cm	2P-	
	H1-90	CIP alvéolaire Champ 10 ⁰	P-	
	H2-91	Lingette devant box gynéco (100µL)	P+	
	H2-92	Fécès H2-P17	P-	
	H2-93	Fécès H2-P12	P+	
	H2-94 à H2-102	Paddock entrée surface	3P+ ; 6P-	
	H2-103 à H2-108	Paddock entrée 5 cm	1 P+ ; 5 P-	
	H2-109	Paddock entrée 50 cm	P-	
	H2-110 à H2-111	Paddock milieu surface	2P-	

Annexe n°19: Tableau Excel présentant la liste des souches de *Rhodococcus equi* isolées pendant la campagne de prélèvement (partie 2)

Souches de R. equi Haras 2 21/04/11	H2-112 à H2-115	Paddock milieu 5 cm	1 P+; 3 P-	PCR réalisée le 16/05/11
	H2-116	Paddock milieu 20 cm	P-	
	H2-117 et H2-118	Paddock abreuvoir surface	2P-	
	H2-119 à H2-122	Paddock abreuvoir 5 cm	4P-	
	H2-123	Paddock abreuvoir 50 cm	P-	
	H2-124 à H2-126	Champ entrée 5 cm	3P-	
	H2-127	Champ entrée 20 cm	P-	
	H2-128	Champ entrée 50 cm	P-	
	H2-129 à H2-134	Champ milieu surface	2P+ ; 4 P-	
	H2-135 à H2-140	Champ milieu 5 cm	6P-	
	H2 - 141	Champ milieu 20 cm	P-	
	H2 - 142	CIP alvéolaire paddock 10 ⁰	P-	
Souches de R. equi Haras 2 6/05/11	H2 - 143	Fécès H2-P3	P +	PCR réalisée le 16/05/11
	H2 - 144 à H2 - 163	Fécès H2-P13	16 P+ ; 4 P-	
	H2 - 164 à H2 - 167	Champ entrée 5 cm	4P-	
	H2 - 168 et H2 - 169	Champs milieu 50 cm	2P-	
	H2 - 170 et H2 - 171	Paddock entrée surface	2P-	
	H2 - 172 et H2 - 173	Paddock entrée 5 cm	2P-	
	H2 - 174 et H2 - 175	Paddock entrée 20 cm	2P-	
	H2 - 176	Paddock entrée 50 cm	P-	
	H2 - 177 et H2 - 178	Paddock abreuvoir surface	1 P+ ; 1 P-	
	H2 - 179	Paddock abreuvoir 20 cm	P-	
	H2 - 180	Paddock milieu surface	P-	
	H2 - 181 et H2- 182	Paddock milieu 5 cm	1 P+ ; 1 P-	
	H2 - 183	Paddock milieu 20 cm	P-	
	H2 - 184	CIP Champ alvéo 10 ⁰ (A)	P-	
	H2 - 185 à H2 - 187	CIP Paddock total 10 ⁰ (A)	1 P+ ; 2 P-	
	H2 - 188	CIP Paddock total 10 ⁰ (B)	P-	
	H2 - 189	CIP Paddock total 10 ⁻¹ (A)	P-	
	H2 - 190	CIP Paddock total 10 ⁻¹ (B)	P-	
	H2 - 191	CIP Paddock alvéo 10 ⁻¹ (A)	P +	
Souches de R.equi Haras 1 9/05/11	H1 - 192	Champ milieu surface	P-	PCR réalisée le 27/05/11
	H1 - 193 à H2 - 197	Paddock entrée 5 cm	2 P+ ; 3 P-	
	H1 - 198	Paddock sel 20 cm	P-	
	H1 - 199	Paddock milieu surface	P+	
	H1 -200	Champ entrée surface	P+	
	H1 - 201	Champ entrée 5 cm	P+	
	H1 - 202	Champ entrée 20 cm	P-	
	H1 - 203	Champ entrée 50 cm	P-	
	H1 - 204	Champ Abreuvoir 50 cm	P-	
	H1 - 205	Champ milieu 20 cm	P-	
Souches de R. equi Haras 1 18/05/11	H1 - 206	Champ entrée 5cm	P +	
	H1 - 207	Champ entrée 50 cm	P -	
	H1 - 208	Champ Abreuvoir 5 cm	P -	
	H1 - 209	Champ milieu 20 cm	P -	
	H1 - 210 et H1 - 211	Paddock entrée surface	2P -	
	H1 - 212 et H1 - 213	Paddock entrée 5 cm	2P -	

Annexe n°19: Tableau Excel présentant la liste des souches de *Rhodococcus equi* isolées pendant la campagne de prélèvement (partie 3)

Souches de R. equi Haras 1 18/05/11	H1 - 214 et H1 - 215	Paddock entrée 20 cm	2P -	
	H1 - 216	Paddock sel 20 cm	P -	
	H1 - 217	Paddock sel 50 cm	P -	
	H1 - 218	CIP Champ total 10^{-1} (A)	P+	
	H1 - 219 à H1 - 221	CIP Paddock total 10^0	3P -	
	H1 - 222 et H1 - 223	CIP Paddock total 10^{-1} (A)	2P -	
	H1 - 224 à H1 - 226	CIP Paddock total 10^{-1} (B)	3P -	
	H1 - 282	Champ entrée 20 cm	P -	
	H1 - 284	CIP Paddock total 10^{-1} (C)	P -	
Souches de R. equi Haras 2 19/05/11	H2 - 227 à H2 - 230	Champ entrée surface	2 P+ ; 2 P-	
	H2 - 231 et H2 - 232	Champ entrée 5 cm	2P -	
	H2 - 233	Champ entrée 20 cm	P -	
	H2 - 234 à H2 - 237	Champ milieu 5 cm	4P -	
	H2 - 238	Paddock entrée surface	P -	
	H2 - 239	Paddock entrée 5 cm	P -	
	H2 - 240	Paddock abreuvoir surface	P -	
	H2 - 241	Paddock abreuvoir 20 cm	P -	
	H2 - 242	Paddock abreuvoir 50 cm	P -	
	H2 - 243	Paddock milieu 5 cm	P -	
	H2 - 244 à H2 - 246	Paddock milieu 20 cm	3P -	
	H2 - 247	gette devant box gynéco (100)	P -	
	H2 - 248 à H2 - 251	CIP Champ total 10^0	4P -	
	H2 - 252 et H2 - 253	CIP Champ total 10^{-1} (A)	2 P+	
	H2 - 254 à H2 - 256	CIP Paddock total 10^0	3P -	
	H2 - 257 à H2 - 259	CIP Paddock total 10^{-1} (A)	P+	
	H2 - 260 et H2 - 261	CIP Paddock total 10^{-1} (B)	2 P +	
	H2 - 262 à H2 - 267	CIP Paddock total 10^{-1} (C)	6P -	
	H2 - 268	CIP Paddock total 10^{-2} (A)	P -	
	H2 - 269	CIP Paddock total 10^{-2} (B)	P -	
Souches de R. equi Haras 1 30/05/11	H2 - 270 et H2 - 271	CIP Paddock Alvéo 10^0 (A)	2P -	
	H2 - 272	CIP Paddock Alvéo 10^0 (B)	P -	
	H2 - 273 à H2 - 281	Fécès H2-P10	2 P+ ; 7 P-	
	H2 - 283	Champ milieu surface	P -	
	H1-285	Paddock entrée surface	P -	
	H1-286 à H1 - 290	Paddock entrée 5 cm	2 P+ ; 3 P-	
	H1-291 à H1 - 295	Paddock entrée 20 cm	3 P - ; 2 P+	
	H1-296 à H1 - 298	Paddock sel 5 cm	3P-	
	H1-299	Paddock milieu surface	1P-	
	H1-300 à H1 - 303	Paddock milieu 20 cm	4P-	
	H1-304	Paddock milieu 50 cm	P-	
	H1-305	Champ entrée 5 cm	P-	
	H1-306	Champ entrée 20 cm	P-	
	H1-307 à H1 - 308	Champ abreuvoir 5 cm	2P-	
	H1-309	Champ milieu surface	P-	
	H1-310	Champ milieu 5 cm	P-	
	H1-311 à H1 - 312	Champ milieu 20 cm	2P-	
	H1 -313 à H1 - 317	CIP Paddock Total 10^{-1} (B)	5P-	
	H1 - 318 à H1 - 319	CIP Paddock Alvéo 10^{-1} (A)	2P-	
	H1 - 320	CIP Paddock Alvéo 10^{-1} (B)	P-	

PCR réalisée le 27/05/11

PCR réalisée le 09/06/11

Annexe n°19: Tableau Excel présentant la liste des souches de *Rhodococcus equi* isolées pendant la campagne de prélèvement (partie 4)

Souches de R. equi Haras 1 30/05/11	H1 - 321	CIP Paddock Alvéo 10^{-1} (C)	P-	PCR réalisée le 09/06/11
	H1 - 322 à H1- 326	CIP Champ Total 10^0	5P-	
	H1 - 353	CIP Champ Alvéo 10^0 (B)	P-	
Souches de R. equi Haras 2 01/06/11	H2 - 327 à H2 - 328	Paddock entrée surface	2P+	
	H2 - 329 à H2 - 337	Paddock entrée 5 cm	7P- ; 2P+	
	H2 - 338	Paddock abreuvoir surface	P-	
	H2 - 339 à H2 - 342	Paddock abreuvoir 5 cm	2P+ ; 2P-	
	H2 - 343 à H2 - 344	Paddock abreuvoir 20 cm	2P-	
	H2 - 345	Paddock abreuvoir 50 cm	P-	
	H2 - 346	Paddock milieu 5 cm	P+	
	H2 - 347	Champ entrée 5 cm	P+	
	H2 - 348	Champ entrée 20 cm	P+	
	H2 - 349	Champ entrée 50 cm	P-	
	H2 - 350	Champ abreuvoir surface	P+	
	H2 - 351 à H2 - 352	Champ milieu 5 cm	2P-	
	H2 - 354 à H2 - 355	Champ milieu 50 cm	2P+	
	H2 - 356	CIP Paddock total 10^0	P+	
	H2 - 357	CIP Paddock total 10^{-1} (A)	P+	
	H2 - 358	CIP Paddock total 10^{-2} (A)	P-	
Souches de R. equi Haras 1 16/06/11	H2 - 359	CIP Paddock Alvéo 10^0 (A)	P-	PCR réalisée le 30/06/11
	H2 - 360	CIP Paddock Alvéo 10^0 (B)	P-	
	H2 - 361	CIP Champ Total 10^{-1} (B)	P-	
Souches de R. equi Haras 2 17/06/11	H2 - 362 à H2 - 363	CIP Champ Alvéo 10^0 (A)	P+; P-	
	H2 - 364	CIP Champ Alvéo 10^{-1} (A)	P+	
	H1-370	Paddock entrée surface	P -	
	H1-371 à H1-374	Paddock entrée 5 cm	4P-	
	H1-375	Paddock milieu surface	P-	
	H2 - 376 à H2-380	Champ entrée surface	5P+	
	H2 - 381 à H2 - 384	Champ entrée 5 cm	2P+ (381;383) ; 2P-	
	H2 - 385 à H2 - 386	Champ entrée 50 cm	P+ ; P-	
	H2 - 387	Champ abreuvoir 20 cm	P-	
	H2 - 388	Champ milieu surface	P+	
	H2 - 389 à H2 - 393	Paddock entrée 5 cm	P+ ; 4P-	
	H2 - 394 à H2 - 397	Paddock entrée 20 cm	P+ (396) ; 3P-	
	H2 - 398 à H2 - 400	Paddock milieu surface	2P+ (398;400) ; P-	
	H2 - 401 à H2 - 408	Paddock milieu 5 cm	7P+ ; P- (403)	
	H2 - 409 à H2 - 410	Paddock milieu 20 cm	P- ; P+	
	H2 - 411 à H2 - 412	Paddock abreuvoir surface	2P-	
	H2 - 413 à H2 - 414	Paddock abreuvoir 5 cm	2P-	
	H2 - 415 à H2 - 416	Paddock abreuvoir 50 cm	2P-	
	H2 - 417	CIP Paddock total 10^0 (A)	P+	
	H2 - 418	CIP Paddock total 10^{-1} (A)	P+	
	H2 - 365	Fécès H2-15	P+	
	H2 - 366 à 369	Fécès H2-P18	3P+ ; P-	

Annexe n° 20: Comparaison des dates moyennes de naissances entre les poulains du haras H1 et ceux du haras H2. Résultats du test de Shapiro-Wilk et du test de Student.

Le test t de Student permet de comparer les dates de naissance moyennes de chaque haras. Cependant, une des conditions d'application de ce test nécessite que les effectifs soient supérieurs à 30 individus pour chaque classe, à moins que la distribution des valeurs suivent une loi normale. Nous avons donc avant tout étudié la normalité des distributions des dates de naissance pour chaque haras et ce grâce au *test de Shapiro-Wilk*. La date de naissance a été traduite en numéro de jour de l'année en fixant le 1^{er} janvier 2011 comme jour 1.

Résultats des tests de Shapiro-Wilk pour les haras H1 (à gauche) et H2 (à droite)

Résultats H1		Résultats H2	
<i>Nb valeurs</i>	16	<i>Nb individus</i>	21
<i>Moyenne</i>	58,5	<i>Moyenne</i>	82,86
<i>Ecart-type</i>	23,55	<i>Ecart-type</i>	29,29
<i>Médiane</i>	55	<i>Médiane</i>	81
<i>Quartile 25%</i>	41	<i>Quartile 25%</i>	66
<i>Quartile 75%</i>	77	<i>Quartile 75%</i>	95
<i>Inter Quartile</i>	36	<i>Inter Quartile</i>	29

Résultats du test de normalité :

$W_{\text{calc}} :$ **0,935**
 $W_{\text{lim}} :$ **0,887**

Résultats du test de normalité :

$W_{\text{calc}} :$ **0,970**
 $W_{\text{lim}} :$ **0,908**

Au vu des résultats du test de Shapiro-Wilk, il ressort que $W_{\text{calc}} \geq W_{\text{lim}}$ pour les deux haras. Ceci ne permet pas de rejeter l'hypothèse H_0 : « La distribution étudiée suit une loi normale », au risque d'erreur inférieur à 5 %. Nous en concluons que la distribution des naissances suit une loi normale dans chacun des haras et que l'utilisation du test t de Student est donc valide. Ainsi, nous étudions la validité de l'hypothèse H_0 : « Les dates de naissance moyennes des deux groupes de poulains, H1 et H2, ne sont pas significativement différentes. » Les conditions d'application du test t de Student sont respectées, c'est à dire que les distributions suivent une loi normale et que les variances sont homogènes.

Résultats du test t de Student. Présentation des valeurs

Résultats	Jour Naissance H1	Jour Naissance H2
<i>Nb sujets</i>	16	21
<i>Moyenne</i>	58,5	82,86
<i>Ecart-Type</i>	23,55	29,29
<i>Médiane</i>	55	81
<i>Quartile 25%</i>	41	66
<i>Quartile 75%</i>	77	95
<i>Inter Quartile</i>	36	29

$T_{\text{calc}} : 2,72$ $T_{\text{lim}} : 2,03$ $P < 0,01$

Annexe n° 21: Comparaison des dates de naissances moyennes entre les pouoins sains et malades du haras H2. Résultats du test Mann-Whitney.

Résultats	Jour Naissance "Sains"	Jour Naissance "Malades"		Jour Naissance "Sains"	Jour Naissance "Malades"
Nb sujets	16	5			
Moyenne	76,56	103		Moy - Sd	48,47
Ecart-Type	28,09	25,77		Min non-atypique	77,23
Médiane	68,5	90		Moyenne	19
Quartile 25%	60	86		Max non-atypique	76,56
Quartile 75%	95	118		Moy + Sd	103
Inter Quartile	35	32			124
Indice U	18,5	61,5			141
					104,7
					128,8

$$Z_{\text{calc}} : 1,775 \quad Z_{\text{lim}} : 1,96 \quad P < 0,076$$

Annexe n° 22: Comparaison des concentrations moyennes de poussières mesurées dans le haras H1 et H2 Résultats du test Mann-Whitney.

Résultats	H1	H2		H1	H2
Nb mesures	12	12		Moy - Sd	-1,84E-03
Moyenne	8,72E-03	0,0171		Min non-atypique	2,05E-03
Ecart-Type	0,0106	0,0150		Moyenne	-1,84E-03
Médiane	3,79E-03	0,0117		Max non-atypique	3,10E-04
Quartile 25%	1,67E-03	5,54E-03		Moy + Sd	8,72E-03
Quartile 75%	0,0192	0,0367			0,0171
Inter Quartile	0,0175	0,0311			0,0324
Indice U	46	98			0,0390
					0,0193
					0,0321

$$Z_{\text{calc}} : 1,501 \quad Z_{\text{lim}} : 1,96 \quad p < 0,13$$

Annexe n° 23: Comparaison des concentrations moyennes de poussières mesurées dans les paddocks et les champs. Résultats du test Mann-Whitney.

Résultats	Paddock	Champ
Nb mesures	8	8
Moyenne	0,0231	8,86E-03
Ecart-Type	0,0154	0,0121
Médiane	0,0280	3,79E-03
Quartile 25%	0,0192	1,37E-03
Quartile 75%	0,0367	0,0122
Inter Quartile	0,0175	0,0108
Indice U	43	21

	Paddock	Champ
Moy - Sd	7,67E-03	-3,26E-03
Min non-atypique	3,10E-04	-3,26E-03
Moyenne	0,0231	8,86E-03
Max non-atypique	0,0390	0,0368
Moy + Sd	0,0385	0,0210

P < 0,28

BIBLIOGRAPHIE

- AINSWORTH, D. M., EICKER, S. W., YEAGAR, A. E., SWEENEY, C. R., VIEL, L., TESAROWSKI, D., LAVOIE, J. P., HOFFMAN, A., PARADIS, M. R., REED, S. M., ERB, H. N., DAVIDOW, E. et NALEVANKO, M. 1998. Associations between physical examination, laboratory, and radiographic findings and outcome and subsequent racing performance of foals with *Rhodococcus equi* infection: 115 cases (1984-1992). *J Am Vet Med Assoc*, **213**, 510-5.
- BARTON, M.D., HUGHES, KL. 1980 *Corynebacterium equi*: a review. *Vet Bull*, **50**, 65-80
- BARTON, M.D., EMBURY, D.H., 1987. Studies of the pathogenesis of *Rhodococcus equi* infection in foals. *Aust Vet J*, **64**, 332-9
- BENOIT, S., BENACHOUR, A., TAOUJI, S., AUFFRAY, Y. & HARTKE, A. 2002. H(2)O(2), which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*, **70**, 3768-76.
- CHAFFIN, M. K., COHEN, N. D. et MARTENS, R. J. 2003a. Evaluation of equine breeding farm management and preventative health practices as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Am Vet Med Assoc*, **222**, 476-85.
- CHAFFIN, M. K., COHEN, N. D., MARTENS, R. J., EDWARDS, R. F. et NEVILL, M. 2003b. Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia on farms with endemic infection. *J Am Vet Med Assoc*, **223**, 1791-9.
- CHAFFIN, M. K., MARTENS RJ., 1997. Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* pneumonia in foals : retrospective study of 61 cases (1988-1996). In *Proceedings 43rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, **43**, 79-80
- CHRISTLEY RM., H. D. 1994. *Rhodococcus equi* pneumonia in foals and the effect on subsequent race performance. *Australian equine veterinarian*, **12**(2), 77-79.
- COHEN, N. D., CARTER, C. N., SCOTT, H. M., CHAFFIN, M. K., SMITH, J. L., GRIMM, M. B., KUSKIE, K. R., TAKAI, S. et MARTENS, R. J. 2008. Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. *Am J Vet Res*, **69**, 385-95.
- COHEN, N. D., O'CONOR, M. S., CHAFFIN, M. K. et MARTENS, R. J. 2005. Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Am Vet Med Assoc*, **226**, 404-13.

- DEBEY, M.C., BAILIE, W.E. 1987. *Rhodococcus equi* in fecal and environmental samples from Kansas horse farms. *Veterinary Microbiology*, **14**, 251-57.
- DELOGE-ABARKAN, M., HA, T. L., ROBINE, E., ZMIROU-NAVIER, D. et MATHIEU, L. 2007. Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH). *J Environ Monit*, **9**, 91-7.
- DOROTHY M. AINSWORTH, A. E. Y., STEVEN W. EICKER 1997. Athletic performance of horses previously infected with *Rhodococcus equi* Pneumonia as foals. *Proceedings of the annual convention of AAEP*, **43**.
- DUCHAINE, C., THORNE, P. S., MERIAUX, A., GRIMARD, Y., WHITTEN, P. et CORMIER, Y. 2001. Comparison of endotoxin exposure assessment by bioaerosol impinger and filter-sampling methods. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 2775-80.
- DUQUESNE, F., HEBERT, L., SEVIN, C., BREUIL, M. F., TAPPREST, J., LAUGIER, C. et PETRY, S. 2010. Analysis of plasmid diversity in 96 *Rhodococcus equi* strains isolated in Normandy (France) and sequencing of the 87-kb type I virulence plasmid. *FEMS Microbiol Lett*, **311**, 76-81.
- FERRY, B., BARADEAU, J.M. 2010. Prévention contre la rhodococcose dans les Haras Nationaux: comment assainir l'environnement du poulian? *Équ'idée*, **70**, 52-54.
- FARIAS, M. R., TAKAI, S., RIBEIRO, M. G., FABRIS, V. E. et FRANCO, S. R. 2007. Cutaneous pyogranuloma in a cat caused by virulent *Rhodococcus equi* containing an 87 kb type I plasmid. *Aust Vet J*, **85**, 29-31.
- GARTON, N. J., GILLERON, M., BRANDO, T., DAN, H. H., GIGUÈRE, S., PUZO, G., PRESCOTT, J. F. et SUTCLIFFE, I. C. 2002. A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production. *J Biol Chem*, **277**, 31722-33.
- GIGUÈRE, S. et PRESCOTT, J. F. 1997. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet Microbiol*, **56**, 313-34.
- GIGUÈRE, S., HONDALUS, M.K., YAGER, J.A., DARRAH, P., MOSSER, D.M., PRESCOTT, J. F. 1999. Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*, **67**, 3548-57.
- GIGUÈRE, S. 2000. *Rhodococcus equi* infections. Recent advances in equine neonatal care. Wilkins P.A. and Palmer J.E. (Eds.), *International Veterinary Information Service*, 28 avril 2000.
- GIGUÈRE, S., JACKS, S., ROBERTS, G.D. et al., 2004. Retrospective comparison of azithromycin, clarithromycin, and erythromycin for the treatment of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *J Vet Intern Med*, **18**, 568–573.
- GORNER, P., FABRIES, J. F., DUQUENNE, P., WITSCHGER, O. et WROBEL, R. 2006. Bioaerosol sampling by a personal rotating cup sampler CIP 10-M. *J Environ Monit*, **8**, 43-8.

- GRIMM, M. B., COHEN, N. D., SLOVIS, N. M., MUNDY, G. D., HARRINGTON, J. R., LIBAL, M. C., TAKAI, S. et MARTENS, R. J. 2007. Evaluation of fecal samples from mares as a source of *Rhodococcus equi* for their foals by use of quantitative bacteriologic culture and colony immunoblot analyses. *Am J Vet Res*, **68**, 63-71.
- HAITES, R. E., MUSCATELLO, G., BEGG, A. P. & BROWNING, G. F. 1997. Prevalence of the virulence-associated gene of *Rhodococcus equi* in isolates from infected foals. *J Clin Microbiol*, **35**, 1642-4.
- HILLIDGE, C. J. 1987. Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Vet Microbiol*, **14**, 337-42.
- HOROWITZ, M. L., COHEN, N. D., TAKAI, S., BECU, T., CHAFFIN, M. K., CHU, K. K., MAGDESIAN, K. G. et MARTENS, R. J. 2001. Application of Sartwell's model (lognormal distribution of incubation periods) to age at onset and age at death of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia as evidence of perinatal infection. *J Vet Intern Med*, **15**, 171-5.
- HUNEAU-SALAUN, A., LE BOUQUIN, S., BEX-CAPELLE, V., HUONNIC, D., BALAINE, L., GUILLAM, M. T., SQUIZANI, F., SEGALA, C. et MICHEL, V. 2011. Endotoxin concentration in poultry houses for laying hens kept in cages or in alternative housing systems. *Br Poult Sci*, **52**, 523-30.
- HUNEAU-SALAUN, A., MICHEL, V., HUONNIC, D., BALAINE, L. et LE BOUQUIN, S. 2010. Factors influencing bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and free-range systems for laying hens under commercial conditions. *Br Poult Sci*, **51**, 163-9.
- JAIN, S., BLOOM, B. R. et HONDALUS, M. K. 2003. Deletion of vapA encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Mol Microbiol*, **50**, 115-28.
- JOHNSON, J. A., PRESCOTT, J. F. et MARKHAM, R. J. 1983. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intrabronchial challenge. *Vet Pathol*, **20**, 440-9.
- KAMBOJ, M., KALRA, A., KAK, V. 2005. *Rhodococcus equi* brain abscess in a patient without HIV. *J Clin Pathol*, **58**, 423-42.
- KEDLAYA, I., ING, M. B. et WONG, S. S. 2001. *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. *Clin Infect Dis*, **32**, E39-46.
- KINNE, J., MADARAME, H., TAKAI, S., JOSE, S. et WERNERY, U. 2011. Disseminated *Rhodococcus equi* infection in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Vet Microbiol*, **149**, 269-72.
- KOTERBA, A. M., WOZNIAK, J. A. et KOSCH, P. C. 1995. Ventilatory and timing parameters in normal horses at rest up to age one year. *Equine Vet J*, **27**, 257-64.

- KUSKIE, K. R., SMITH, J. L., WANG, N., CARTER, C. N., CHAFFIN, M. K., SLOVIS, N. M., STEPUSIN, R. S., CATTOI, A. E., TAKAI, S. et COHEN, N. D. 2011. Effects of location for collection of air samples on a farm and time of day of sample collection on airborne concentrations of virulent *Rhodococcus equi* at two horse breeding farms. *Am J Vet Res*, **72**, 73-9.
- LETEK, M., OCAMPO-SOSA, A. A., SANDERS, M., FOGARTY, U., BUCKLEY, T., LEADON, D. P., GONZALEZ, P., SCORTTI, M., MEIJER, W. G., PARKHILL, J., BENTLEY, S. et VAZQUEZ-BOLAND, J. A. 2008. Evolution of the *Rhodococcus equi* vap pathogenicity island seen through comparison of host-associated vapA and vapB virulence plasmids. *J Bacteriol*, **190**, 5797-805.
- MAGNUSON, H. 1923. Spezifische infektiose pneumonie biem fohlen. Ein neurer eiterreger biem pferd. *Arch. Wiss Prakt Tierheilk.* **500**, 22-38
- MAKRAI, L., TAKAI, S., TAMURA, M., TSUKAMOTO, A., SEKIMOTO, R., SASAKI, Y., KAKUDA, T., TSUBAKI, S., VARGA, J., FODOR, L., SOLYMOSI, N. et MAJOR, A. 2002. Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Vet Microbiol*, **88**, 377-84.
- MARTENS, R. J., COHEN, N. D., CHAFFIN, M. K. et WASKOM, J. S. 2002. Association of pneumonia in foals caused by *Rhodococcus equi* with farm soil geochemistry. *Am J Vet Res*, **63**, 95-8.
- MARTENS, R.J., COHEN, N.D., CHAFFIN, M.K *et al.*, 2002. Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Am Vet Med Assoc*, **221**, 825–833.
- MARTENS, R. J., COHEN, N. D., JONES, S. L., MOORE, T. A. et EDWARDS, J. F. 2005. Protective role of neutrophils in mice experimentally infected with *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*, **73**, 7040-2.
- MARTENS, R. J., TAKAI, S., COHEN, N. D., CHAFFIN, M. K., LIU, H., SAKURAI, K., SUGIMOTO, H. et LINGSWEILER, S. W. 2000. Association of disease with isolation and virulence of *Rhodococcus equi* from farm soil and foals with pneumonia. *J Am Vet Med Assoc*, **217**, 220-5.
- MAUGER, C. 2009. Étude rétrospective de la rhodococcose à partir d'une population de 1617 poulains autopsiés au laboratoire d'études et de recherches en pathologie équine de 1986 à 2006. *Thèse vétérinaire*, Toulouse 3- 4051.
- MEIJER, W. G. et PRESCOTT, J. F. 2004. *Rhodococcus equi*. *Vet Res*, **35**, 383-96.
- MICHEL, V. et HUONNIC, D. 2003. A comparison of welfare, health and production performance of laying hens reared in cages or in aviaries. *Br Poult Sci*, **44**, 775-6.
- MONEGO, F., MABONI, F., KREWER, C., VARGAS, A., COSTA, M. et LORETO, E. 2009. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farms by means of multiplex PCR for the vap gene family. *Curr Microbiol*, **58**, 399-403.

- MOUSSA, A. 2009. Étude mathématique et numérique du transport d'aérosols dans le poumon humain. *Thèse de doctorat*. École Normale Supérieure de Cachan.
- MUSCATELLO, G. 2011. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal - Part 1: Pathogenesis and epidemiology. *Vet J*. Oct 17. Elsevier Ltd.
- MUSCATELLO, G. et BROWNING, G. F. 2004. Identification and differentiation of avirulent and virulent *Rhodococcus equi* using selective media and colony blotting DNA hybridization to determine their concentrations in the environment. *Vet Microbiol*, **100**, 121-7.
- MUSCATELLO, G., ANDERSON, G. A., GILKERSON, J. R. et BROWNING, G. F. 2006a. Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 6152-60.
- MUSCATELLO, G., GERBAUD, S., KENNEDY, C., GILKERSON, J. R., BUCKLEY, T., KLAY, M., LEADON, D. P. et BROWNING, G. F. 2006b. Comparison of concentrations of *Rhodococcus equi* and virulent *R. equi* in air of stables and paddocks on horse breeding farms in a temperate climate. *Equine Vet J*, **38**, 263-5.
- MUSCATELLO, G., GILKERSON, J. R. et BROWNING, G. F. 2007. Comparison of two selective media for the recovery, isolation, enumeration and differentiation of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol*, **119**, 324-9.
- MUSCATELLO, G., GILKERSON, J. R. et BROWNING, G. F. 2009. Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. *J Clin Microbiol*, **47**, 734-7.
- PREScott, J. F. 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, **4**, 20-34.
- PREScott, J.F, TRAVERS, M., YAGER-JOHNSON, J.A. 1984. Epidemiological survey of *Corynebacterium equi* infections on five Ontario horse farms. *Can J Comp Med*, **48**, 10-13.
- REN, J. et PREScott, J. F. 2003. Analysis of virulence plasmid gene expression of intramacrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Vet Microbiol*, **94**, 167-82.
- RODRIGUEZ-LAZARO, D., LEWIS, D. A., OCAMPO-SOSA, A. A., FOGARTY, U., MAKRAI, L., NAVAS, J., SCORTTI, M., HERNANDEZ, M. et VAZQUEZ-BOLAND, J. A. 2006. Internally controlled real-time PCR method for quantitative species-specific detection and vapA genotyping of *Rhodococcus equi*. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 4256-63.
- SELLON D., L. M. 2007. *Rhodococcus equi*. *Equine infectious diseases*, Chap 32, 281-295. Elsevier Ltd.
- SMITH, B. P. et ROBINSON, R. C. 1981. Studies of an outbreak of *Corynebacterium equi* pneumonia in foals. *Equine Vet J*, **13**, 223-8.

- STEWART, S. L., GRINSHPUN, S. A., WILLEKE, K., TERZIEVA, S., ULEVICIUS, V. et DONNELLY, J. 1995. Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 1232-9.
- SYDOR, T., VON BARGEN, K., BECKEN, U., SPUERCK, S., NICHOLSON, V. M., PRESCOTT, J. F. et HAAS, A. 2008. A mycolyl transferase mutant of *Rhodococcus equi* lacking capsule integrity is fully virulent. *Vet Microbiol*, **128**, 327-41.
- TAKAI, S., CHAFFIN, M. K., COHEN, N. D., HARA, M., NAKAMURA, M., KAKUDA, T., SASAKI, Y., TSUBAKI, S. et MARTENS, R. J. 2001. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. *J Vet Diagn Invest*, **13**, 489-94.
- TAKAI, S., TAKAHAGI, J., SATO, Y., YAMAGUCHI, K., KAKIZAKI, S., TAKEHARA, S., MATSUKURA, S., TAMADA, Y., TANI, A., SASAKI, Y., TSUBAKI, S., KAMADA, M. 1994. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* in horses and their environments. In ed. H. Nakajima et P.D. Rossdale, Equine Infectious Diseases VII. R and W Publications limited, 183-87.
- TAKAI, S., HINES, S.A., SAKIZAKI, T., NICHOLSON, V.M. 2000. DNA sequence and comparaison of virulence from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infection and Immunity*, **68**, 6840-7
- TAKAI, S., FUJIMORI, T., KATSUZAKI, K. & TSUBAKI, S. 1987. Ecology of *Rhodococcus equi* in horses and their environment on horse-breeding farms. *Vet Microbiol*, **14**, 233-9.
- TAKAI, S., MARTENS, R. J., JULIAN, A., GARCIA RIBEIRO, M., RODRIGUES DE FARIA, M., SASAKI, Y., INUZUKA, K., KAKUDA, T., TSUBAKI, S. et PRESCOTT, J. F. 2003. Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from cats and dogs. *J Clin Microbiol*, **41**, 4468-70.
- TAKAI, S., NARITA, K., ANDO, K. et TSUBAKI, S. 1986. Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in soil on a horse-breeding farm. *Vet Microbiol*, **12**, 169-77.
- TAPPREST J., L. C., SEVIN C., FOUCHER N., DUQUESNE, F., HENRY-AMAR N., 2012. Pulmonary rhodococcosis in foals: risk factors related to horse husbandry in France. *Revue de Médecine Vétérinaire de Toulouse*. Sous presse.
- TERZIEVA, S., DONNELLY, J., ULEVICIUS, V., GRINSHPUN, S. A., WILLEKE, K., STELMA, G. N. et BRENNER, K. P. 1996. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 2264-72.
- TOPINO, S., GALATI, V., GRILLI, E. et PETROSILLO, N. 2010. *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected individuals: case reports and review of the literature. *AIDS Patient Care STDS*, **24**, 211-22.

TSE, K. C., TANG, S. C., CHAN, T. M. et LAI, K. N. 2008. *Rhodococcus* lung abscess complicating kidney transplantation: successful management by combination antibiotic therapy. *Transpl Infect Dis*, **10**, 44-7.

VAN ERCK, E., VOTION, D., ART, T. et LEKEUX, P. 2004. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet J*, **36**, 21-8.

VENNER, M., KERTH, R., KLUG, E. 2007. Evaluation of tulathromycin in the treatment of pulmonary abscesses in foals. *Vet Journal*. **174**, 418-21

WOOLCOCK, J. B., FARMER, A. M. et MUTIMER, M. D. 1979. Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. *J Clin Microbiol*, **9**, 640-2.

ZINK, M. C., YAGER, J. A. et SMART, N. L. 1986. *Corynebacterium equi* Infections in Horses, 1958-1984: A Review of 131 Cases. *Can Vet J*, **27**, 213-7.

NF ISO 16000-17 Air intérieur. Détection et dénombrement des moisissures. Méthode par culture. Février 2009.

NF ISO 7708 Qualité de l'air. Définitions des fractions de taille des particules pour l'échantillonnage lié aux problèmes de santé. Mai 1996.

NF X 43-262 Qualité de l'air. Détermination gravimétrique du dépôt alvéolaire de la pollution particulaire. Méthode de la coupelle rotative. Octobre 1990.

NF EN 13098 :2000-12 Formules de calcul des UFC à partir des suspensions liquides obtenues par des échantilleurs à « impingement » ou des échantilleurs à filtre.

NF EN 481 Atmosphères des lieux de travail - Définition des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air

AIR IDEAL®3P Manuel d'utilisation, Biomérieux, REF 96307, Version E 03/2008

CIP 10, CIP 10 M Manuel d'utilisation, ARELCO, Département hygiène toxicologie

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE QUANTIFICATION DE *RHODOCOCCUS EQUI* DANS L'AIR

NOM et Prénom : PHILIPOT Damien

RÉSUMÉ:

La rhodococcose est la première cause de mortalité chez le poulain de 1 à 6 mois. Les poulains s'infectent principalement par inhalation de poussières contaminées par *Rhodococcus equi* virulent. Il est admis que c'est la capacité d'aérosolisation de *Rhodococcus equi* qui est l'aspect le plus critique de l'épidémiologie de la maladie. Pourtant, une seule technique de quantification de *Rhodococcus equi* dans l'air a été publiée jusqu'à présent. Notre étude a permis de mettre au point et de valider un nouveau protocole de quantification de *Rhodococcus equi* virulent en aérosol. Cette technique de prélèvement par impingement est plus fiable que les techniques par impaction. Cette mesure embarquée permet de déterminer l'exposition réelle d'un cheval. Enfin, nous pouvons sélectionner la fraction de l'air dans laquelle le prélèvement doit être effectué. Par ailleurs, les résultats obtenus dans 2 haras (un haras sain et un haras atteint) semblent confirmer que la mesure de la concentration en *Rhodococcus equi* virulent dans l'air peut être un bon indicateur du risque d'un élevage vis-à-vis de l'apparition de cas de rhodococcose.

MOTS-CLÉS : RHODOCOCOSE / *RHODOCOCCUS EQUI* / BRONCHO-PNEUMONIE / POUSSIÈRE / AÉROSOL / TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT / IMPINGEMENT / ÉQUIDÉ / POULAIN

JURY:

Président : Pr

Directeur : Pr QUINTIN-COLONNA Françoise

Assesseur : Pr ELOIT Marc

Invitée : Dr TAPPREST Jackie

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE TO QUANTIFY *RHODOCOCCUS EQUI* IN THE AIR

SURNAME : PHILIPOT

Given name : Damien

SUMMARY:

Rhodococciosis is the leading cause of death in foals under 6 months of age. Foals are mainly infected by the inhalation of dust contaminated by the virulent strain of *Rhodococcus equi*. Several studies have suggested that the tendency of virulent *Rhodococcus equi* to remain in a bioaerosol form is the most critical aspect of the disease's epidemiology. However, only one technique for quantifying *Rhodococcus equi* in the air has been published so far. Our study has allowed us to develop and validate a new protocol for quantifying *Rhodococcus equi* in the air. Impingement sampling is more reliable method than the impaction method. Furthermore, by fixing the sampler to the horses' head, his real exposure can be determined. Eventually we can also select the size fraction of the sample to be taken. Moreover, the results obtained in two stud farms (one unaffected and one endemically affected) seem to confirm that measuring the concentration of virulent *Rhodococcus equi* in the air may be a good indicator of the risk of appearance of cases of rhodococciosis facing a stud .

KEYWORDS : RHODOCOCCOSIS / *RHODOCOCCUS EQUI* / BRONCHOPNEUMONIA/ DUST / AEROSOL / SAMPLING TECHNIQUE / IMPINGEMENT / EQUINE / FOAL //

JURY :

President : Pr

Director : Pr QUINTIN-COLONNA Françoise

Assessor : Pr ELOIT Marc

Guest : Dr TAPPREST Jackie