

Année 2014

**CORRÉLATION ENTRE LA PRÉSENCE DE
RHODOCOCCLUS EQUI VIRULENT ET NON VIRULENT
DANS L'ENVIRONNEMENT DES POULAINS ET LA
PRÉSENCE DE CAS DANS LES HARAS
EN BASSE-NORMANDIE**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le ...

par

Edmond, Marie, Jacques, Henri ROY

Né le 20 Novembre 1988 à Versailles (Yvelines)

JURY

Président : Pr.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directeur : Dr PRADIER Sophie

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Assesseur : Pr Henri-Jean BOULOUIS

Professeur à l'ENVA

Invitée : Dr. TAPPREST Jackie

**Chef de l'unité Epidémiologie et Anatomie Pathologique au Laboratoire de Pathologie Equine de
l'ANSES-Dozulé**

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur GOGNY Marc

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs : COTARD Jean-Pierre, MIALOT Jean-Paul, MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard.

Professeurs honoraires : Mme et MM. : BENET Jean-Jacques, 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 par intérim : M. GRANDJEAN Dominique, Professeur - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

UNITE DE CARDIOLOGIE - Mme CHETBOUL Valérie, Professeur * - Mme Gkouni Vassiliki, Praticien hospitalier - Mme SECHI-TREHIOU, Praticien hospitalier UNITE DE CLINIQUE EQUINE - M. AUDIGIE Fabrice, Professeur - M. DENOIX Jean-Marie, Professeur - Mme BERTONI Lélia, Maître de conférences contractuel - Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier * - M. LECHARTIER Antoine, Maître de conférences contractuel - Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Praticien hospitalier - Mme TRACHSEL Dagmar, Maître de conférences contractuel UNITE D'IMAGERIE MEDICALE - Mme PEY Pascaline, Maître de conférences contractuel - Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier UNITE DE MEDECINE - Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel - M. BLOT Stéphane, Professeur * - Mme FREICHE-LEGROS Valérie, Praticien hospitalier - Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT - Mme CLERO Delphine, Maître de conférences contractuel - M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * - Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel	DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION - M. PARAGON Bernard, Professeur DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE - Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES - M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - M. CHERMETTE René, Professeur (rattaché au DSBP) - Mme FAIVRE Noëlle, Praticien hospitalier - M. GUILLOT Jacques, Professeur * - Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences - M. POLACK Bruno, Maître de conférences UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE - M. FAYOLLE Pascal, Professeur - M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences - M. MANASSERO Mathieu, Maître de conférences contractuel - M. MOISSONNIER Pierre, Professeur* - Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) - Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Professeur - M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS - Mme STEBLAJ Barbara, Praticien Hospitalier DISCIPLINE : NOUVEAUX ANIMAUX DE COMPAGNIE - M. PIGNON Charly, Praticien hospitalier
---	--

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

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

UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE - M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences - M. BOLNOT François, Maître de conférences * - M. CARLIER Vincent, Professeur UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES - Mme DUFOUR Barbara, Professeur* - Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur - Mme PRAUD Anne, Maître de conférences - Mme RIVIERE Julie, Maître de conférences contractuel UNITE DE PATHOLOGIE DES ANIMAUX DE PRODUCTION - M. ADJOU Karim, Maître de conférences * - M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel - M. MILLEMANN Yves, Professeur	UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE - Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences - M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Mme MAENHOUDT Cindy, Praticien hospitalier - Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel - M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - M. REMY Dominique, Maître de conférences* UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE - M. ARNE Pascal, Maître de conférences - M. BOSSE Philippe, Professeur* - M. COURREAU Jean-François, Professeur - Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur - Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences - M. PONTER Andrew, Professeur
--	---

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

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

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 DISCIPLINE : ANGLAIS - Mme CONAN Muriel, Professeur certifié UNITE DE BIOCHIMIE - M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* - Mme LAGRANGE Isabelle, Praticien hospitalier - M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES - M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE - M. PHILIPS Pascal, Professeur certifié DISCIPLINE : ETHOLOGIE - Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE - Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences - M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur*	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 UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE - M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Mme LE ROUX Delphine, Maître de conférences - Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE - Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur - M. PERROT Sébastien, Maître de conférences - M. TISSIER Renaud, Professeur* UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE - Mme COMBRISSE Hélène, Professeur - Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences - M. TIRET Laurent, Maître de conférences* UNITE DE VIROLOGIE - M. ELOIT Marc, Professeur - Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences *
---	---

* responsable d'unité

REMERCIEMENTS

Au Professeur de la faculté de Médecine de Créteil,

Qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Au Dr. Sophie PRADIER,

Pour m'avoir guidé dans ce projet, m'avoir aidé à organiser mon travail et à construire une enquête épidémiologique rigoureuse.

Au Pr. Henri-Jean BOULOUIS,

Pour votre aide précieuse dans ce travail et particulièrement vos conseils avisés concernant les modes de prélèvement et la gestion des prélèvements bactériologiques.

Au Dr Jackie TAPPREST,

Pour votre soutien et votre confiance tout au long de l'étude et plus particulièrement pendant les séances de prélèvements dans les élevages. Je remercie l'ensemble du laboratoire de l'ANSES-Dozulé pour leur accueil chaleureux, ainsi que leur aide et leur expertise indispensables à la conduite de ce travail.

Au Dr Aude GIRAUDET,

Qui me fait le plaisir et l'honneur de participer à ce jury.

A mes Parents,

Pour leur amour et leur soutien indéfectible au quotidien ! Merci !

A l'ensemble de ma famille,

A l'origine de mon orientation vers ce « métier passion », au plus proche des animaux et de la nature.
Et plus particulièrement à mes deux grand-mères qui m'inspirent au quotidien par leur force morale et leur exemple.

A Anne,

Pour ta présence réconfortante à mes côtés, je nous sens tellement complémentaires pour avancer tous les deux sur le chemin de la vie. Je t'aime.

A mes amis,

Vous sur qui je peux toujours compter dans les moments les plus agréables et festifs comme dans les moments douloureux.

A l'ensemble de mes enseignants depuis 25 ans,

Pour m'avoir guidé dans la recherche de l'amélioration permanente, et m'avoir appris à comprendre avant d'apprendre.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	7
LISTE DES ANNEXES	8
DEFINITIONS ET ABREVIATIONS	9
LISTE DES UNITES DE MESURE.....	9
INTRODUCTION	11
1. PRESENTATION DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> ET DES DIFFERENTES FORMES DE RHODOCOCLOSE	13
1.1. CARACTERES GENERAUX DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i>	13
1.2. CULTURE ET RECONNAISSANCE DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i>	13
1.3. HABITAT ET POUVOIR PATHOGENE.....	14
1.3.1. PRESENCE DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> DANS L'ENVIRONNEMENT	14
1.3.2. PORTAGE INTESTINAL DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i>	15
1.3.3. FACTEURS DE VIRULENCE.....	16
1.3.3.1. <i>Pathogénicité de Rhodococcus equi</i>	16
1.3.3.2. <i>Rôle de la paroi cellulaire dans la virulence de Rhodococcus equi.</i>	16
1.3.3.3. <i>Rôle de l'equi factor dans la virulence de Rhodococcus equi</i>	17
1.3.3.4. <i>Etude du plasmide de virulence de Rhodococcus equi</i>	17
1.3.3.4.1. Régulation de l'expression des gènes du plasmide de virulence de <i>Rhodococcus equi</i>	18
2. RHODOCOCLOSE PULMONAIRE DU POULAIN : ETUDE CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIE.....	19
2.1. PREVALENCE	19
2.2. ETUDE CLINIQUE DE LA RHODOCOCLOSE DU POULAIN	19
2.2.1. <i>Forme pulmonaire</i>	19
2.2.1.1. Présentation clinique.....	19
2.2.1.2. Examens complémentaires décrits pour la confirmation du diagnostic de forme pulmonaire de Rhodococcose.....	20
2.2.1.3. Lésions retrouvées à l'autopsie.....	21
2.2.2. <i>Formes non pulmonaire</i>	21
2.2.2.1. Forme digestive.....	21
2.2.2.2. Autres formes décrites	21
2.2.2.3. Symptômes dus à un dysfonctionnement immunitaire.....	22
2.2.2.4. La rhodococcose chez les autres espèces	22
2.3. MODES D'INFECTION	22
2.4. REACTION IMMUNITAIRE CONTRE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i>	23
2.5. PROPHYLAXIE MEDICALE, TRAITEMENTS ET ANTIBIORESISTANCE	23
2.6. CRITERES DIAGNOSTIQUES.....	24
2.6.1. <i>Critères décrits dans la littérature permettant d'établir un diagnostic de certitude d'infection par Rhodococcus equi</i>	24
2.6.2. <i>Critères utilisés par les vétérinaires de Basse-Normandie pour établir le diagnostic d'infection par Rhodococcus equi</i>	25

2.7.	FACTEURS DE RISQUE	27
2.7.1.	<i>Facteurs de risques liés à la composition de l'élevage</i>	28
2.7.1.1.	Influence de la superficie et de la densité des animaux dans l'élevage	28
2.7.2.	Influence de la surcharge de travail et du contact avec des animaux extérieurs à l'élevage	29
2.7.2.1.	Influence de la qualité de l'environnement et de la maîtrise sanitaire de l'élevage.....	29
2.7.3.	<i>Facteurs liés à la conduite d'élevage et à la gestion de la reproduction</i>	30
2.8.	EXPOSITION DANS L'ENVIRONNEMENT.....	32
2.8.1.	<i>Influence de la concentration en Rhodococcus equi dans le sol</i>	32
2.8.2.	<i>Influence de la concentration en Rhodococcus equi dans l'air</i>	32
3.	MATERIEL ET METHODES DE L'ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE	35
3.1.	OBJECTIFS DE L'ETUDE	35
3.2.	RECRUTEMENT DES ELEVAGES	35
3.2.1.	<i>Classement des élevages indemnes (témoins) / enzootiques (atteints)</i>	35
3.2.2.	<i>Mode de recrutement</i>	36
3.2.2.1.	Contact avec les vétérinaires	37
3.2.2.2.	Contact avec les éleveurs	37
3.2.3.	<i>Choix de la date de visite dans les élevages</i>	38
3.2.4.	<i>Questionnaire épidémiologique rempli avec les éleveurs le jour des prélèvements</i>	39
3.3.	PROTOCOLES DE PRELEVEMENTS	40
3.3.1.	<i>Prélèvements d'air dans l'environnement des poulains</i>	40
3.3.1.1.	Comparaison des différents types de collecteurs d'air.....	40
3.3.1.2.	Appareil utilisé : le QP 10-M.....	41
3.3.1.3.	Efficacité du prélèvement des particules en fonction de leur taille (GÖRNER <i>et al.</i> , 2006).....	43
3.3.1.4.	Estimation de la proportion de bactéries revivifiables après prélèvement par le CIP 10-M.....	45
3.3.1.5.	Protocole de réalisation des prélèvements d'air	47
3.3.2.	<i>Protocoles de réalisation des prélèvements de terre</i>	50
3.3.2.1.	Prélèvements de terre à l'extérieur	50
3.3.2.2.	Prélèvements de surface dans le box.....	51
3.3.3.	<i>Déroulement des prélèvements dans les haras</i>	51
3.4.	TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS AU LABORATOIRE	52
3.4.1.	<i>Traçabilité des prélèvements</i>	52
3.4.2.	<i>Mise en culture bactériologique</i>	53
3.4.2.1.	Prélèvements d'air	53
3.4.2.2.	Prélèvements de terre à l'extérieur	54
3.4.2.3.	Prélèvements de surface dans les box.....	54
3.4.3.	<i>Lecture des géloses</i>	54
3.4.4.	<i>Calcul du nombre d'UFC de Rhodococcus equi par unité de volume d'air.</i>	55
3.4.5.	<i>Recherche du plasmide de virulence par PCR</i>	56
3.4.6.	<i>Mesure de l'humidité et du pH</i>	57
3.4.6.1.	Détermination du taux d'humidité de la terre.....	57
3.4.6.2.	Détermination du pH de la terre	57
3.5.	METHODES UTILISEES POUR L'ANALYSE STATISTIQUE	58
4.	RESULTATS	59
4.1.	DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON.....	59
4.1.1.	<i>Déroulement et résultat du recrutement des haras</i>	59
4.1.2.	<i>Chronologie des séances de prélèvements</i>	60
4.1.3.	<i>Présentation des élevages visités</i>	61
4.1.3.1.	Historique des cas de rhodococcose.....	61
4.1.3.2.	Année de création des haras.....	64
4.1.3.3.	Nombre de chevaux dans les haras visités.....	64

4.1.3.4.	Surface des haras et densité des poulains	66
4.1.3.5.	Nombre de personnel dans le haras et estimation de la capacité d'accueil	69
4.2.	ETUDE DES PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE DE DEVELOPPEMENT DE RHODOCOCLOSE PULMONAIRE DANS LES ELEVAGES DE NOTRE ECHANTILLON.....	71
4.2.1.	<i>Introduction d'animaux extérieurs au haras et mélange avec les animaux résidents</i>	<i>71</i>
4.2.2.	<i>Mesures de prophylaxie contre la rhodococcose et suivi de la santé des poulains</i>	<i>74</i>
4.2.3.	<i>Gestion de l'environnement des poulains</i>	<i>77</i>
4.2.3.1.	Qualité de l'environnement des bâtiments d'élevage.....	77
4.2.3.2.	Qualité de l'environnement dans les box	80
4.2.3.3.	Qualité de l'environnement dans les paddocks.....	82
4.2.3.4.	Qualité de l'environnement dans les champs.....	87
4.3.	ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> DANS LES ELEVAGES VISITES.....	93
4.3.1.	<i>Estimation de la survie de Rhodococcus equi dans notre protocole de prélèvement avec le CIP10 M</i> 93	
4.3.1.1.	Influence de la rotation de la coupelle sur l'évaporation du BHI qu'elle contient.....	93
4.3.1.2.	Influence du temps de prélèvement sur la survie de Rhodococcus equi virulent.....	95
4.3.1.2.1.	Conservation du plasmide de virulence	96
4.3.2.	<i>Isolement de Rhodococcus equi dans le box.....</i>	<i>97</i>
4.3.2.1.	Isolement de <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air du box.....	97
4.3.2.2.	Isolement de <i>Rhodococcus equi</i> sur le sol du box.....	100
4.3.3.	<i>Isolement de Rhodococcus equi dans le paddock.....</i>	<i>100</i>
4.3.3.1.	Isolement de <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air du paddock	100
4.3.3.2.	Isolement de <i>Rhodococcus equi</i> dans le sol du paddock	104
4.3.4.	<i>Isolement de Rhodococcus equi dans le champ.....</i>	<i>106</i>
4.3.4.1.	Isolement de <i>Rhodococcus equi</i> dans l'air du champ	106
4.3.4.2.	Isolement de <i>Rhodococcus equi</i> dans le sol du champ.....	110
5.	DISCUSSION	113
5.1.	CARACTERISTIQUES DES ELEVAGES ETUDIES, COMPARAISON DES ELEVAGES ATTEINTS ET TEMOINS	113
5.2.	MODE DE RECRUTEMENT DES HARAS ET DEROULEMENT DES SEANCES DE PRELEVEMENTS	114
5.3.	PROTOCOLES DE PRELEVEMENTS ET MISE EN EVIDENCE DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i>	116
5.3.1.	<i>Recherche de Rhodococcus equi dans l'air</i>	<i>116</i>
5.3.2.	<i>Recherche de Rhodococcus equi dans le sol</i>	<i>121</i>
	CONCLUSION	125
	BIBLIOGRAPHIE.....	127

Liste des figures

FIGURE 1 : SCHEMA DES ELEMENTS COMPOSANTS LA TETE DU CIP-10M (EXTRAIT DU MANUEL D'UTILISATION DU CIP, EDETE PAR LA SOCIETE TECORA)	42
FIGURE 2 : SCHEMA PRESENTANT LE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA COUPELLE ROTATIVE DU CIP 10M (EXTRAIT DU MANUEL D'UTILISATION DU CIP, EDETE PAR TECORA)	43
FIGURE 3 : EVOLUTION DE L'EFFICACITE DE LA COLLECTE DES PARTICULES PAR LE CIP 10-M, PRESENTES DANS L'AIR EN FONCTION DE LEUR TAILLE. (GÖRNER, FABRIES, DUQUENNE, WITSVHGER, & WROBEL, 2006).	44
FIGURE 4 : CONCENTRATION DE BACTERIES CULTIVABLES. LES CONCENTRATIONS LIMITES DETECTABLES C_{LD} DES DEUX TYPES D'APPAREILS UTILISES SONT RAPPELEES. (GÖRNER, FABRIES, DUQUENNE, WITSVHGER, & WROBEL, 2006)	45
FIGURE 5 : CONCENTRATION EN BACTERIES TOTALES OBSERVEES PAR COLORATION DAPI. LES CONCENTRATIONS LIMITES DETECTABLES C_{LD} DES DEUX TYPES D'APPAREILS UTILISES SONT RAPPELEES. (GÖRNER <i>ET AL.</i> , 2006)	45
FIGURE 6 : RECAPITULATIF DE LA COMMUNICATION DANS LE RECRUTEMENT DES ELEVAGES.	60
FIGURE 7 : NOMBRE DE CAS DE RHODOCOCLOSE PULMONAIRE DANS LES ELEVAGES ATTEINTS DE NOTRE ECHANTILLONS POUR LES ANNEES 2009, 2010, 2011 ET 2012.	63
FIGURE 8 : ANNEE DEPUIS LAQUELLE LES TERRES SONT UTILISEES POUR HEBERGER DES CHEVAUX DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET LES HARAS ATTEINTS (N=6).	64
FIGURE 9 : NOMBRE DE CHEVAUX DANS LES ELEVAGES TEMOINS ET ATTEINTS	65
FIGURE 10 : NOMBRE DE POULAINS PRESENTS EN 2012 DANS LES ELEVAGES TEMOINS ET LES ELEVAGES ATTEINTS.	66
FIGURE 11 : SURFACE TOTALE EN HERBE DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET LES HARAS ATTEINTS (N=6).	66
FIGURE 12 : STH DEDIEE A L'ELEVAGE DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET LES HARAS ATTEINTS (N=2).	67
FIGURE 13 : DENSITE DES CHEVAUX DANS LES ELEVAGES TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6) CALCULEE EN DIVISANT LE NOMBRE TOTAL DE CHEVAUX PAR LA SURFACE TOTALE EN HERBE (STH) DU HARAS	68
FIGURE 14 : DENSITE DES POULAINS DANS LES HARAS TEMOINS (N=2) ET ATTEINTS (N=6). LE HARAS H6 N'APPARAÎT PAS SUR CE GRAPHIQUE EN RAISON DE SON FONCTIONNEMENT PARTICULIER, LA DENSITE DES POULAINS Y EST DE 5,2 PAR HECTARE.	69
FIGURE 15 : NOMBRE DE CHEVAUX DIVISE PAR LE NOMBRE D'UTH INTERVENANT DANS CHAQUE ELEVAGE. TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	70
FIGURE 16 : NOMBRE DE POULINIERES EXTERIEURES HEBERGEES DANS LES HARAS TEMOINS (N= 3) ET ATTEINT (N=6).	72
FIGURE 17 : DISTANCE ENTRE LE BATIMENT HEBERGEANT LES POULAINS ET LA FUMIERE DANS LES ELEVAGES TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	78
FIGURE 18 : SUPERFICIE DES BOX DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINT (N=6).	80
FIGURE 19 : FREQUENCE DE RETRAIT DES CROTTINS DANS LES BOX DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	82
FIGURE 20 : SURFACE DU Paddock UTILISE DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	83
FIGURE 21 : DENSITE DES MAXIMALE EN NOMBRE DE POULINIERES SUITEES PAR HECTARE DANS LES PADDOCKS DES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	84
FIGURE 22 : MEDIANE DU DE LA PROPORTION D'AIRES SANS HERBE DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6)	85
FIGURE 23 : NOTE DE POUSSIERE DANS LES PADDOCKS DES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	85
FIGURE 24 : HUMIDITE DE LA TERRE DANS LE Paddock POUR LES HARAS TEMOINS (N=2) ET LES HARAS ATTEINTS (N=5). LE LOT DES HARAS TEMOINS NE COMPRENANT QUE 2 HARAS POUR CETTE MESURE, LE MAXIMUM NON ATYPIQUE CORRESPOND AU HARAS H5 ET LE MINIMUM NON ATYPIQUE AU HARAS H6.	86
FIGURE 25 : PH DE LA TERRE DANS LE Paddock POUR LES HARAS TEMOINS (N=2) ET LES HARAS ATTEINTS (N=5). LE LOT DES HARAS TEMOINS NE COMPRENANT QUE 2 HARAS POUR CETTE MESURE, LE MAXIMUM NON ATYPIQUE CORRESPOND AU HARAS H6 ET LE MINIMUM NON ATYPIQUE AU HARAS H5.	87
FIGURE 26 : SURFACE DU CHAMP DANS LES ELEVAGES TEMOINS (N=3) ET LES ELEVAGES ATTEINTS (N=6).	88
FIGURE 27 : DENSITE MAXIMALE DE JUMENTS SUITEES DANS LE CHAMP DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	89
FIGURE 28 : PROPORTION D'AIRES SANS HERBES DANS LES CHAMPS DES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	90
FIGURE 29 : NOTE DE POUSSIERE DANS LE CHAMP DES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	91

FIGURE 30 : HUMIDITE DE LA TERRE DANS LE CHAMP POUR LES HARAS TEMOINS (N=2) ET LES HARAS ATTEINTS (N=5). LE LOT DES HARAS TEMOINS NE COMPRENANT QUE 2 HARAS POUR CETTE MESURE, LE MAXIMUM NON ATYPIQUE CORRESPOND AU HARAS H5 ET LE MINIMUM NON ATYPIQUE AU HARAS H6.	91
FIGURE 31 : PH DE LA TERRE DES CHAMPS DANS LES HARAS TEMOINS (N=2) ET ATTEINTS (N=5). LE LOT DES HARAS TEMOINS NE COMPRENANT QUE 2 HARAS POUR CETTE MESURE, LE MAXIMUM NON ATYPIQUE CORRESPOND AU HARAS H6 ET LE MINIMUM NON ATYPIQUE AU HARAS H5 .	92
FIGURE 32 : VOLUME MOYEN DE BHI RECOLTE EN FONCTION DU TEMPS DE ROTATION DU CIP10 M EN ATMOSPHERE CONTROLEE. PAR DEFAUT LA VALEUR A 0 MINUTE CORRESPOND AU VOLUME DE BHI INTRODUIT DANS LES COUPELLES EN DEBUT DE MANIPULATION. TOUTES LES COUPELLES AYANT TOURNE 180 MINUTES ONT ETE CONSTATEES VIDES A LA FIN DE LA MANIPULATION.	94
FIGURE 33 : SURVIE DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> DANS LES COUPELLES TEMOIN LORS DE LA MANIPULATION 1 ET DE LA MANIPULATION 2.	95
FIGURE 34 : SURVIE DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> EN FONCTION DU TEMPS DE ROTATION DU CIP10 M EN CONDITIONS EXPERIMENTALES.	96
FIGURE 35 : TEMPERATURE DANS LE BOX RELEVÉE AU DEBUT DU PRELEVEMENT D’AIR DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=5).	97
FIGURE 36 : HUMIDITE DE L’AIR RELEVÉE A L’ENTREE DU BOX AU DEBUT DU PRELEVEMENT D’AIR DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=5).	98
FIGURE 37 : VITESSE DE ROTATION DE LA COUELLE DES CIP 10M PLACES A L’ENTREE DU BOX DANS LES HARAS SAINS (N=2) ET ATTEINT (N=5), AU DEBUT ET A LA FIN DU PRELEVEMENT. NE DISPOSANT PAS DE MESURE POUR LE HARAS H5, LA MEDIANE N’A PAS ETE CALCULEE POUR LES HARAS SAINS.	98
FIGURE 38 : VITESSE DE ROTATION DE LA COUELLE DES CIP 10M PLACES AU FOND DU BOX DANS LES HARAS SAINS (N=2) ET ATTEINT (N=5), AU DEBUT ET A LA FIN DU PRELEVEMENT. NE DISPOSANT PAS DE MESURE POUR LE HARAS H5, LA MEDIANE N’A PAS ETE CALCULEE POUR LES HARAS SAINS.	99
FIGURE 39 : VITESSE DU VENT MESUREE EN M/S DANS LES PADDOCKS DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	100
FIGURE 40 : TEMPERATURE RELEVÉE DANS LE PADDOCK DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	101
FIGURE 41 : HUMIDITE DE L’AIR MESUREE DANS LES PADDOCKS DES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6) AU DEBUT DU PRELEVEMENT D’AIR.	102
FIGURE 42 : VITESSE DE ROTATION DES COUPELLES DES CIP 10M MESUREES AU DEBUT ET A LA FIN DU PRELEVEMENT D’AIR DANS LE PADDOCK DANS LES HARAS TEMOINS (N=2) ET ATTEINTS (N=6).	102
FIGURE 43 : CONCENTRATION DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> VIRULENT DANS L’AIR SUR LE PADDOCK ETUDIE DANS LES HARAS DU LOT TEMOIN (N=3) ET ATTEINT (N=6).	103
FIGURE 44 : HUMIDITE DU SOL MESUREE DANS LES PADDOCKS DES HARAS TEMOINS (N=2) ET ATTEINTS (N=5).	104
FIGURE 45 : PH DU SOL DANS LES PADDOCKS DES HARAS TEMOINS (N=2) ET ATTEINTS (N=5).	104
FIGURE 46 : VENT MESURE DANS LES CHAMPS DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6), AU DEBUT DU PRELEVEMENT D’AIR.	107
FIGURE 47 : TEMPERATURE EN °C RELEVÉE DANS CHAQUE CHAMP ETUDIE DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6), AU DEBUT DU PRELEVEMENT D’AIR.	108
FIGURE 48 : HUMIDITE DE L’AIR DANS LES CHAMPS DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6), RELEVÉE AU DEBUT DU PRELEVEMENT D’AIR.	108
FIGURE 49 : VITESSE DE ROTATION DES COUPELLES DES CIP 10M EN DEBUT ET EN FIN DE PRELEVEMENT DANS LES HARAS TEMOINS (N=2) ET ATTEINTS (N=6).	109
FIGURE 50 : CONCENTRATION DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> VIRULENT DANS L’AIR SUR LE CHAMP ETUDIE DANS LES HARAS DU LOT TEMOIN (N=3) ET ATTEINT (N=6).	110
FIGURE 51 : HUMIDITE DE LA TERRE DU CHAMP DANS LES HARAS TEMOINS (N=2) ET ATTEINTS (N=5).	110
FIGURE 52 : PH DU SOL DANS LES CHAMPS DES HARAS TEMOINS (N=2) ET ATTEINTS (N=5).	111

Liste des Tableaux

TABEAU 1 : FREQUENCE D'UTILISATION DES CRITERES DIAGNOSTIQUES USUELLEMENT DECRITS DANS LA LITTERATURE POUR LA CONFIRMATION D'UNE SUSPICION DE PNEUMONIE DUE A <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> PAR LES VETERINAIRES BAS-NORMANDS AYANT REPONDU A L'ETUDE DE 2005 (TAPPREST <i>ET AL.</i> , 2012)	26
TABEAU 2 : TABLEAU SYNTHETISANT LES ETUDES MENEES CONCERNANT LES INDICATEURS DE RISQUE DE DEVELOPPER LA MALADIE EN FONCTION DE LA COMPOSITION DES ELEVAGES ATTEINTS OU SAINS. "+" TRADUIT QUE L'INDICATEUR EST POSITIVEMENT CORRELE AVEC LA PRESENCE DE LA MALADIE; "0" TRADUIT QUE L'INDICATEUR N'EST PAS CORRELE AVEC LA MALADIE ; "-" TRADUIT QUE L'INDICATEUR EST NEGATIVEMENT CORRELE AVEC LA PRESENCE DE LA MALADIE ; "*" TRADUIT QUE L'ASSOCIATION EST STATISTIQUEMENT SIGNIFICATIVE ;	28
TABEAU 3 : TABLEAU SYNTHETISANT LES ETUDES MENEES CONCERNANT LES INDICATEURS DE RISQUE DE DEVELOPPER LA MALADIE EN FONCTION DE LA CONDUITE D'ELEVAGE DANS LES ELEVAGES ATTEINTS OU SAINS. "+" TRADUIT QUE L'INDICATEUR EST POSITIVEMENT CORRELE AVEC LA PRESENCE DE LA MALADIE; "0" TRADUIT QUE L'INDICATEUR N'EST PAS CORRELE AVEC LA MALADIE ; "-" TRADUIT QUE L'INDICATEUR EST NEGATIVEMENT CORRELE AVEC LA PRESENCE DE LA MALADIE ; "*" TRADUIT QUE L'ASSOCIATION EST STATISTIQUEMENT SIGNIFICATIVE ;	31
TABEAU 4 : CONCENTRATIONS MEDIANES DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> ET <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> VIRULENT RECUEILLIES DANS LES HARAS EN IRLANDE EN JUIN, JUILLET ET AOUT 2003 (MUSCATELLO, <i>ET AL.</i> , 2006).	33
TABEAU 5 : HISTORIQUE DES CAS DE PNEUMONIE A <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> COMMUNIQUEES PAR L'ELEVEUR AU COURS DES TROIS ANNEES PRECEDENTES. LES CAS 2012 ONT ETE RECENSES PAR CONTACT TELEPHONIQUE ENTRE JANVIER ET FEVRIER 2013. *LES VALEURS DE LA COLONNE « APPROXIMATION DE LA PREVALENCE » ONT ETE CALCULEES A TITRE INDICATIF EN REALISANT LA SOMME DES CAS DEPUIS 2009, DIVISEE PAR 4 ET PAR LE NOMBRE DE NAISSANCES EN 2012.	62
TABEAU 6 : COMPOSITION DES HARAS VISITES. LES HARAS T0 ET R0 SONT RESPECTIVEMENT LE HARAS SAIN ET LE HARAS ATTEINT QUI AVAIENT PARTICIPE A L'ETUDE AYANT PERMIS LA MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE PRELEVEMENTS (PHILIPOT, 2012) ; LE HARAS H9 CORRESPOND AU HARAS R0 DANS LEQUEL NOUS SOMMES RETOURNES EN FIN DE SAISON. *STH = SURFACE TOUJOURS EN HERBE	65
TABEAU 7 : CAPACITE D'ACCUEIL DANS LES HARAS DE NOTRE ECHANTILLON.	70
TABEAU 8 : FREQUENCE D'INTRODUCTION DE POULINIERES EXTERIEURES DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET LES ELEVAGES ATTEINTS (N=6) DE NOTRE ECHANTILLON.	71
TABEAU 9 : FREQUENCE DE MELANGE DES POULINIERES EXTERIEURES ET DES POULINIERES RESIDENTES SUR LES CHAMPS ET LES PADDOKS DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	73
TABEAU 10 : FREQUENCE DE PARTAGE DES INSTALLATIONS MEDICALES DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6). PAR DEFAUT NOUS CONSIDERONS QUE DANS LES ELEVAGES OU IL N'Y A PAS D'ANIMAUX DE PASSAGE, IL N'Y A PAS DE PARTAGE DU MATERIEL.	73
TABEAU 11 : FREQUENCE DES NAISSANCES APRES LE MOIS DE MAI DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET LES HARAS ATTEINTS (N=6).	75
TABEAU 12 : FREQUENCE DE CONTROLE DE LA CONCENTRATION SANGUINE DU POULAIN EN IGG DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	76
TABEAU 13 : FREQUENCE DE PRESENCE D'UNE AIRE D'ATTENTE EN TERRE DEVANT LA SALLE D'ECHOGRAPHIE DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6)	79
TABEAU 14 : FREQUENCE D'ENVIRONNEMENT POUSSIEREUX DES POULAINS DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	79
TABEAU 15 : ETAT DE LA LITIERE DANS LES HARAS DU LOT TEMOIN (N=3) ET ATTEINT (N=6).	81
TABEAU 16 : FREQUENCE DE RETRAIT DES CROTTINS DANS LA LITIERE DU BOX QUAND TRAITE DE MANIERE BINAIRE (AU MOINS UNE FOIS PAR JOUR OU MOINS D'UNE FOIS PAR JOUR), DANS LES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	82
TABEAU 17 : FREQUENCE DE PRESENCE D'UNE PERIODE DE REPOS POUR LES PADDOKS DANS LES HARAS VISITES TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	83
TABEAU 18 : FREQUENCE DE PRESENCE D'UNE PERIODE DE REPOS POUR LES CHAMPS DANS LES HARAS VISITES TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6).	88
TABEAU 19 : DENSITE MAXIMALE DE JUMENTS SUITEES DANS LES CHAMPS PAR RAPPORT AU SEUIL DE 2/HA.	89

TABEAU 20 : RECAPITULATIF DES ESSAIS MENES AU LABORATOIRE POUR TESTER LA SURVIE DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> DANS LES CONDITIONS DE PRELEVEMENT D'AIR.	93
TABEAU 21 : VOLUME MOYEN DE BHI (EN ML) RECUPERE. DANS CHAQUE MANIPULATION, LE VOLUME A 0 MINUTES CORRESPOND AU VOLUME RESTANT DANS LA COUPELLE DU CIP NON ALLUME (TEMOIN) RECUPERE APRES L'EXTINCTION DU DERNIER APPAREIL DE LA MANIPULATION EN COURS.	94
TABEAU 22 : VITESSE DU VENT MESURES DANS LE Paddock DES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6) PAR RAPPORT AU SEUIL DE 1M.S^{-1} .	101
TABEAU 23 : TABLEAU DE CONTINGENCE ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> VIRULENT DANS LE SOL DES PaddockS DANS LES HARAS DU LOT TEMOIN (N=3) ET ATTEINT (N=6). NOUS CONSIDERONS QUE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> EST PRESENT SUR LE Paddock S'IL EST RETROUVE DANS AU MOINS UN DES SIX PRELEVEMENTS DE TERRE REALISES SUR LE Paddock ETUDIE.	105
TABEAU 24 : TABLEAU DE CONTINGENCE ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> NON VIRULENT DANS LE SOL DES PaddockS DANS LES HARAS DU LOT TEMOIN (N=3) ET ATTEINT (N=6). NOUS CONSIDERONS QUE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> EST PRESENT SUR LE Paddock S'IL EST RETROUVE DANS AU MOINS UN DES SIX PRELEVEMENTS DE TERRE REALISES SUR LE Paddock ETUDIE.	106
TABEAU 25 : VITESSE DU VENT MESUREE DANS LES CHAMPS DES HARAS TEMOINS (N=3) ET ATTEINTS (N=6) PAR RAPPORT AU SEUIL DE 1M.S^{-1} .	107
TABEAU 26 : TABLEAU DE CONTINGENCE ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> NON VIRULENT DANS LE SOL DES CHAMPS DANS LES HARAS DU LOT TEMOIN (N=3) ET ATTEINT (N=6). NOUS CONSIDERONS QUE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> EST PRESENT SUR LE CHAMP SI IL EST RETROUVE DANS AU MOINS UN DES SIX PRELEVEMENTS DE TERRE REALISES SUR LE CHAMP ETUDIE.	111
TABEAU 27 : COMPARAISON DES PRELEVEMENTS D'AIR DANS LE CHAMP DES HARAS T0 (TEMOIN) ET R0 (ATTEINT) ENTRE LA VALIDATION DE LA TECHNIQUE EN 2011 ET NOTRE ETUDE EN 2012.	118
TABEAU 28 : COMPARAISON DES PRELEVEMENTS D'AIR DANS LE Paddock DES HARAS T0 (TEMOIN) ET R0 (ATTEINT) ENTRE LA VALIDATION DE LA TECHNIQUE EN 2011 ET NOTRE ETUDE EN 2012.	119
TABEAU 29 : CORRELATION ENTRE L'ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> VIRULENT DANS L'AIR ET DANS LE SOL DANS LES PaddockS.	121
TABEAU 30 : CORRELATION ENTRE L'ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> NON VIRULENT DANS L'AIR ET DANS LE SOL DANS LES PaddockS.	122
TABEAU 31 : CORRELATION ENTRE L'ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> VIRULENT DANS L'AIR ET DANS LE SOL DANS LES CHAMPS.	122
TABEAU 32 : CORRELATION ENTRE L'ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> NON VIRULENT DANS L'AIR ET DANS LE SOL DANS LES CHAMPS.	122

Liste des photographies

PHOTOGRAPHIE 1 : COLONIES DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i> EN CULTURE SUR UNE BOITE COLUMBIA A L'ACIDE NALIDIXIQUE ET A LA COLIMYCINE (ANC)(COURTOISIE DE CORINNE SEVIN).....	14
PHOTOGRAPHIE 2 : CIP 10-M AVEC LA COUPELLE A GAUCHE; SUR LA PHOTO DE DROITE, LE CARTER DE PROTECTION ET LA BUSE ONT ETE FIXES (GÖRNER <i>ET AL.</i> , 2006).....	42
PHOTOGRAPHIES 3 ET 4 : LE « RHODOPOUS » PERMET LA FIXATION DU CIP10M AU LICOL D'UNE JUMENT SUITEE, SANS PERTURBER L'ASPIRATION DE L'AIR (COURTOISIE DAMIEN PHILIPOT).....	49
PHOTOGRAPHIE 5 : RESULTATS DE LA PCR APRES REVELATION PAR LA « GBOX » (COURTOISIE CORINNE SEVIN, ANSES-DOZULE) ..	57
PHOTOGRAPHIE 6 : BARRE DE GYNECOLOGIE.....	74
PHOTOGRAPHIE 7 : COLOTEST® PERMETTANT DE TESTER LA CONCENTRATION DU COLOSTRUM EN ANTICORPS (CREDIT : COVETO®).....	76
PHOTOGRAPHIE 8 : SNAP FOAL®, APRES AVOIR DEPOSE UN ECHANTILLON SANGUIN DU POULAIN, UN INDICATEUR COLORE NOUS INDIQUE LA FOURCHETTE DE CONCENTRATION DES IGG DANS LE SANG DU POULAIN (<400G/L : POULAIN IMMUNODEPRIME 400-800 G/L : POULAIN DOUTEUX >800G/L : POULAIN PROTEGE). (CREDIT : WWW.PHARMA-ANIMAL.COM).....	77

Liste des Annexes

ANNEXE 1 : GUIDE POUR LES APPELS AUX ELEVEURS.	131
ANNEXE 2 : COURRIER ENVOYE AUX ELEVEURS APRES LEUR ACCORD DE PRINCIPE LORS DU CONTACT TELEPHONIQUE.	132
ANNEXE 3 : FORMULAIRE ENVOYE AUX ELEVEURS EN MEME TEMPS QUE LE COURRIER AFIN DE COMPLETER LES INFORMATIONS CONCERNANT LE STATUT DU HARAS ET D'ORGANISER LE JOUR DE NOTRE VISITE	133
ANNEXE 4 : GUIDE POUR LES APPELS AUX VETERINAIRES TRAITANTS	134
ANNEXE 5 : COURRIER ENVOYE AUX VETERINAIRES APRES LE CONTACT TELEPHONIQUE POUR COMPLETER LES INFORMATIONS SUR LES ELEVAGES DE LEUR CLIENTELE.	135
ANNEXE 6 : QUESTIONNAIRE ENVOYE AUX VETERINAIRES EN MEME TEMPS QUE LE COURRIER PRECEDENT.....	136
ANNEXE 7 : ETUDE DE LA VARIABILITE DE LA VITESSE DE ROTATION DES CIP EN FONCTION DE LA COUPELLE UTILISEE.....	137
ANNEXE 8 : DESCRIPTION DES VARIABLES UTILISEES	138
ANNEXE 9 : PRESENTATION DES RESULTATS : QUESTIONNAIRE EPIDEMIOLOGIQUE 1/2.....	143
ANNEXE 10 : PRESENTATION DES RESULTATS : QUESTIONNAIRE EPIDEMIOLOGIQUE 2/2.....	144
ANNEXE 11 : PRESENTATION DES RESULTATS : CARACTERISTIQUES DES CHAMPS.	145
ANNEXE 12 : PRESENTATION DES RESULTATS : ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> DANS LES CHAMPS.....	146
ANNEXE 13 : PRESENTATION DES RESULTATS : CARACTERISTIQUES DES PADDOCKS.	147
ANNEXE 14 : PRESENTATION DES RESULTATS : ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> DANS LES PADDOCKS.	148
ANNEXE 15 : PRESENTATION DES RESULTATS : CARACTERISTIQUES DES BOXES.	149
ANNEXE 16 : PRESENTATION DES RESULTATS, ISOLEMENT DE <i>RHODOCOCCLUS EQUI</i> DANS LES BOXES.....	150

Définitions et abréviations

NR : Non Renseigné
PS : Pur-Sang
SF : Selle Français
STH : Surface Totale en Herbe
SIRE : Système d'Identification Relatif aux Equidés
TF : Trotteur Français
VAP : Virulence Associated Protein
ORF : Open Reading Frame

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 présent dans l'environnement et le tube digestif des herbivores qui est réputé comme l'une des causes principales de pneumonies chez les poulains à l'échelle mondiale. La forme pulmonaire de la rhodococcose, la plus répandue, se manifeste par une pneumonie pyo-granulomateuse, pouvant entraîner la mort des poulains atteints et peut-être causer des baisses de performances à l'âge adulte chez les animaux guéris. Le traitement de la rhodococcose pulmonaire des poulains nécessite une antibiothérapie agressive, de longue durée et coûteuse.

Rhodococcus equi est un germe commensal de l'environnement des herbivores, mais certains élevages présentent chaque année plusieurs cas de pneumonie, alors que d'autres restent indemnes. De nombreuses études ont été et sont menées afin de mieux comprendre le mode d'infection de *Rhodococcus equi* et la réponse immunitaire des poulains confrontés à la bactérie. Il est actuellement admis que l'infection des poulains se fait par l'inhalation de souches virulentes de *Rhodococcus equi* dès les premières heures de vie, sans avoir encore déterminé la dose nécessaire à l'infection d'un animal. Les poulains déclarent les signes cliniques de la maladie à l'âge de 1 à 6 mois quand l'immunité transmise par le colostrum de la mère diminue et que l'immunité propre du poulain n'est pas encore mature. Cependant, de récentes études de dépistage par échographie ont montré que des poulains peuvent présenter des lésions pulmonaires de rhodococcose qui régressent sans nécessité de traitement et sans jamais présenter de signes cliniques.

En parallèle, de nombreuses études épidémiologiques sont réalisées dans des haras atteints et des haras indemnes de pneumonies à *Rhodococcus equi* afin d'identifier les facteurs de risque de l'infection à l'échelle des élevages et permettre la mise en place de mesures zootechniques de prophylaxie.

Notre objectif est de réaliser une étude comparative entre des haras atteints et des haras témoins dans une région d'élevage (Basse-Normandie) afin d'identifier les différences quant à la présence de *Rhodococcus equi* dans l'environnement des poulains dans ces deux types de haras. Les prélèvements d'air (supposé être le moyen d'infection) et de sol (supposé être un réservoir) ont été analysés en bactériologie et complétés par une enquête épidémiologique dans les élevages étudiés reprenant les facteurs de risque précédemment décrits comme favorisant la présence de cas dans les haras (nombre d'animaux, densité des animaux, mesures de lutte mises en place...).

Pour cela, nous avons utilisé un protocole innovant de prélèvement d'air développé au laboratoire de l'ANSES-Dozulé en 2011 (PHILIPOT, 2012) permettant un échantillonnage pendant une longue durée avec un appareil embarqué sur le licol de la jument poulinière.

Après une étude bibliographique sur *Rhodococcus equi*, les facteurs de risque de la rhodococcose pulmonaire et les précédentes mesures de la présence de la bactérie dans l'environnement des poulains, nous présenterons la mise en place de l'enquête réalisée en 2012 et les résultats obtenus.

1. Présentation de *Rhodococcus equi* et des différentes formes de Rhodococcose

1.1. Caractères généraux de *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi est un coccobacille Gram positif, isolé pour la première fois en 1923 par Magnusson, chez un poulain atteint présentant une bronchopneumonie purulente. La bactérie était initialement appelée *Corynebacterium equi* ou *Mycobacterium equi*, la nomenclature officielle autorise toujours la dénomination de *Corynebacterium equi*, cependant ce nom n'est plus beaucoup utilisé.

Les genres *Rhodococcus* et *Nocardia* sont regroupés dans la classe des *Actinobacteria*, sous-classe des *Actinobacteridae*, ordre des *Actinomycetales*, sous-ordre des *Corynebacterineae*, famille des *Nocardiaceae*.

Rhodococcus equi est une bactérie :

- Gram positif,
- Immobile, non flagellée,
- Non sporulée,
- Capsulée,
- Aérobie facultative,
- Catalase positive,
- Pléomorphe, pouvant varier d'une forme coccobacillaire à bacillaire : des formes coccobacillaires donnent naissance à de courts bacilles, puis à des filaments plus ou moins ramifiés qui par fragmentation redonnent des coccobacilles ou de petits bacilles,
- Partiellement acido-résistante.

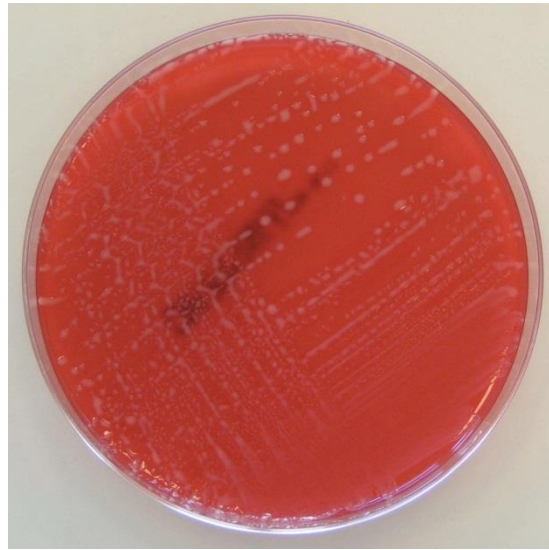
1.2. Culture et reconnaissance de *Rhodococcus equi*

La température optimale de croissance est de 37°C. Après 24 heures de culture en aérobiose sur milieux ordinaires ou sur gélose au sang de mouton, les colonies sont rondes, muqueuses, filantes, non hémolytiques. Les colonies se pigmentent en rose saumon en 48 à 72 heures (EUZEBY, 2002).

En bouillon, la croissance se traduit par un trouble homogène sans dépôt.

En coloration de Gram, observée au microscope électronique, la bactérie a un aspect reconnaissable.

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



1.3. Habitat et pouvoir pathogène

1.3.1.Présence de *Rhodococcus equi* dans l'environnement

Rhodococcus equi est un germe ubiquiste retrouvé sur les surfaces où pâturent des herbivores ; mais aussi dans le tube digestif et les fèces de nombreux animaux.

L'habitat et l'écologie de la bactérie dans les élevages de chevaux ont longtemps été étudiés afin de comprendre quels en sont ses réservoirs. Dans un élevage de la préfecture d'Aomori au Japon, *Rhodococcus equi* a été isolé dans les crottins frais de poulinières et de leurs poulains, ainsi que dans le sol jusqu'à 20 cm de profondeur (TAKAI *et al.*, 1986b).

La concentration de *Rhodococcus equi* dans la terre varie au cours de l'année, elle augmente entre les mois de mars et juillet jusqu'à 10^4 UFC/g de terre (COHEN *et al.*, 2008), c'est-à-dire pendant la période où les poulains âgés de 1 à 6 mois sont présents sur les pâtures.

TAKAI *et al.* (TAKAI *et al.*, 1986b) ont montré que le sol est un milieu favorable à la croissance de *Rhodococcus equi*, et que la bactérie se multiplie pratiquement aussi rapidement à 20°C qu'à 37°C, son optimum de croissance. *Rhodococcus equi* possède l'équipement métabolique spécialisé dans l'utilisation des nutriments contenus dans les fèces et les pâtures des herbivores (dégradation des acides gras volatiles) ; en revanche la bactérie a perdu de nombreuses compétences métaboliques usuellement retrouvées chez les bactéries de l'environnement (dégradation des sucres) (LETEK *et al.*, 2010).

L'analyse du génome de la bactérie montre qu'elle possède de nombreux gènes permettant sa résistance à la dessiccation et au stress oxydatif qui l'accompagne (LETEK *et al.*, 2010).

La croissance de *Rhodococcus equi* est favorisée dans les sols à pH neutre à légèrement alcalin, enrichis en acides gras présents dans les crottins des chevaux. La croissance de *Rhodococcus equi* n'est inhibée dans le sol qu'à des pH extrêmes (pH<5 ou pH>9) ; *Rhodococcus equi* est sensible aux températures supérieures à 45°C.

Il y a donc un cycle de *Rhodococcus equi* entre les chevaux et leur environnement : les animaux contaminent les pâtures par leurs fèces, puis ingèrent les bactéries en broutant le sol. Celui-ci jouerait donc un rôle de réservoir alimenté par les crottins des animaux qui pâturent mais serait aussi un lieu de multiplication de la bactérie.

1.3.2. Portage intestinal de *Rhodococcus equi*

Lors d'une étude comparative dans deux élevages Japonais (un sain et un présentant chaque année des cas de rhodococcose), Takai *et al.* ont montré que *Rhodococcus equi* est présent dans les fèces extraits du rectum dès la première semaine de vie, chez des poulains qui développeront la maladie comme chez des poulains qui ne présenteront aucun signe clinique de rhodococcose. *Rhodococcus equi* est isolé dans les fèces des poulains dès deux semaines d'âge dans l'élevage n'ayant pas d'historique de cas de rhodococcose et dès 3 jours dans l'élevage présentant régulièrement des cas. Dans les deux élevages, la concentration en *Rhodococcus equi* dans les fèces des poulains augmente de la même manière jusqu'à la 5^{ème} semaine de vie (4×10^4 germes par gramme de fèces) puis se maintient pendant 3 semaines pour ensuite diminuer. 100 % des poulains testés ont montré la présence de *Rhodococcus equi* au moins une fois dans leurs fèces. La diminution de la concentration en *Rhodococcus equi* coïncide avec le début de l'ingestion d'aliments solides en remplacement du lait de la mère, qui s'accompagne d'une prolifération des germes anaérobies (TAKAI *et al.*, 1986a).

Dans cette même étude (TAKAI *et al.*, 1986a), les auteurs ont montré que *Rhodococcus equi* est présent dans le tube digestif des animaux adultes dans des concentrations similaires quel que soit le statut de l'élevage.

Lors d'une étude dans un haras contaminé au Kentucky (GRIMM *et al.*, 2007), en 2004 et 2005, les auteurs ont recherché la présence de *Rhodococcus equi* dans les fèces des poulinières ayant eu des poulains ces années-là. En parallèle, un suivi clinique et des échographies pulmonaires des poulains permettaient de déterminer ceux atteints de pneumonies à *Rhodococcus equi*. Le diagnostic était confirmé par culture bactériologique sur le liquide récupéré par aspiration trans-trachéale. Les deux années, les auteurs ont retrouvé la bactérie dans les fèces de chacune des poulinières au moins une fois, il n'y avait pas de différence dans la fréquence d'isolement de *Rhodococcus equi* ni dans sa concentration dans les fèces entre les poulinières dont le poulain avait eu une rhodococcose pulmonaire et celles dont le poulain était resté sain. Le suivi dans l'élevage sur ces deux années a montré que le fait qu'une poulinière ait eut un poulain atteint la première année ne permettait pas de prédire que le poulain de l'année suivante serait lui aussi atteint.

Rhodococcus equi peut utiliser les lipides et assimiler de l'azote inorganique, ce qui lui permet de survivre et se multiplier dans l'intestin et les fèces des herbivores riches en acides gras volatiles (LETEK *et al.*, 2010). Il semblerait que *Rhodococcus equi* puisse être considéré comme un hôte normal

du tube digestif des chevaux. La présence de la bactérie dans les fèces ne semble pas jouer un rôle déterminant dans l'infection des poulains, mais pourrait contribuer à l'acquisition de l'immunité des jeunes animaux contre le germe.

Les essais d'infection chez les souris et les poulains ont montré que toutes les souches de *Rhodococcus equi* ne sont pas pathogènes, nous allons donc étudier les facteurs de virulence de *Rhodococcus equi*.

1.3.3. Facteurs de virulence

1.3.3.1. Pathogénicité de *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi est un germe intracellulaire facultatif qui infecte les phagocytes mononucléaires. Dans le tissu pulmonaire, ce sont les macrophages alvéolaires qui sont infectés. Après phagocytose, les phagosomes contenant les bactéries commencent leur maturation normalement, jusqu'au stade d'endosome précoce. Les souches virulentes de *Rhodococcus equi* ont la capacité de bloquer le processus de maturation empêchant l'acidification de l'endosome et la fusion avec des lysosomes (FERNANDEZ-MORA *et al.*, 2005). *Rhodococcus equi* virulent continue ainsi de se multiplier dans les macrophages infectés causant leur mort par nécrose ; ceci entraîne une réaction inflammatoire pyogranulomateuse conduisant à la formation d'abcès et des lésions des tissus avoisinants.

Afin de survivre dans les macrophages alvéolaires, la bactérie a dû s'adapter au milieu de vie intracellulaire auquel s'ajoutent de nombreux mécanismes antibactériens. La résistance à une baisse de pH ou à un stress *in vitro* avec de l' H_2O_2 ne semble pas différente entre les souches non pathogènes et les souches possédant le plasmide de virulence. En revanche, en présence d' H_2O_2 , certains gènes du plasmide de virulence sont surexprimés (vapA en particulier) (BENOIT *et al.*, 2002).

L'équipement cellulaire de *Rhodococcus equi* lui permet de se développer dans les vacuoles des macrophages pauvres en acides aminés (capacité à assimiler l'azote inorganique) et riches en lipides issus de la dégradation des membranes (LETEK *et al.*, 2010). Par ailleurs, son métabolisme anaérobie facultatif lui permet de se développer dans un tissu nécrotique.

Plusieurs constituants de *Rhodococcus equi* ont été testés afin de découvrir lesquels sont responsables de sa pathogénicité.

1.3.3.2. Rôle de la paroi cellulaire dans la virulence de *Rhodococcus equi*.

La paroi de *Rhodococcus equi* est constituée de polymères de mannose, glucose, rhamnose et d'acide glucuronique. 27 sérotypes de capsules sont connus pour *Rhodococcus equi*. Les sérotypes 1 et 2 sont le plus souvent retrouvés sur les souches isolées à partir de poulains malades, mais il n'y a pas de corrélation entre le sérotype et la virulence de la souche (PRESCOTT, 1981).

La perte de la structure de la capsule ne supprime pas la phagocytose des bactéries et préserve le pouvoir pathogène de la bactérie pour les souris (SYDOR *et al.*, 2008). Cependant à la suite d'une

mutation des gènes codant les enzymes permettant l'édification des polymères constitutifs de la capsule (glycosyltransférase et polysaccharide polymérase), une modification de l'aspect de la paroi sur les colonies en culture et une diminution de la survie dans les macrophages sont observés. La paroi permettrait donc d'améliorer la résistance de *Rhodococcus equi* dans les vacuoles de phagocytose (MACARTHUR *et al.*, 2012).

Les antigènes capsulaires seraient un indicateur de l'origine géographique de la souche, mais ne sont pas responsables de la pathogénicité de *Rhodococcus equi* pour les poulains.

1.3.3.3. Rôle de l'*equi factor* dans la virulence de *Rhodococcus equi*

L'*equi factor* regroupe deux enzymes sécrétées par la bactérie, la phospholipase C et la cholestérol oxydase.

La cholestérol oxydase pourrait contribuer à la dégénérescence des membranes des macrophages, fournissant alors des acides gras disponibles pour la croissance de *Rhodococcus equi*. Cependant, les bactéries mutantes ne possédant pas cette enzyme sont toujours capables de se multiplier dans les macrophages et sont autant pathogènes que les souches sauvages pour les poulains et les souris (PEI *et al.*, 2006).

1.3.3.4. Etude du plasmide de virulence de *Rhodococcus equi*

Toutes les souches pouvant induire expérimentalement la maladie ou retrouvées dans les lésions de poulains atteints de pneumonie à *Rhodococcus equi* possèdent une lipoprotéine de 15 à 17 kDa appelée VapA (Virulence Associated Protein a). Cette lipoprotéine est codée par le gène *vapA* intégré dans le plasmide de virulence de 80 à 90 kilobases présent en au moins un exemplaire chez les souches virulentes de *Rhodococcus equi* et dont la délétion entraîne la disparition du pouvoir pathogène de la souche (WADA *et al.*, 1997).

A ce jour, nous connaissons 12 types de plasmides de virulence avec des profils de restriction différents ; ces différences semblent être des marqueurs géographiques de l'origine de la souche (MUSCATELLO *et al.*, 2011a).

Le plasmide de virulence héberge les gènes codant les neuf protéines nécessaires au blocage de la maturation des endosomes après la phagocytose de *Rhodococcus equi*, à la survie et à la multiplication intracellulaire de la bactérie (Vap A, VapC – VapI, pseudo-VapE). Le séquençage des plasmides de virulence de deux souches de *Rhodococcus equi* (ATCC 33701 et 103) a mis en évidence la présence de 64 ORF¹ dans trois zones sur le plasmide de virulence (TAKAI *et al.*, 2000) :

- Un îlot de pathogénicité limité par les ORF 61 et 22 qui sont des éléments d'insertion et contient des séquences moins riches en bases C-G que le reste du plasmide, ce qui indique qu'il est constitué de gènes étrangers à *Rhodococcus equi*. L'îlot de pathogénicité regroupe les sept gènes Vap (VapA, VapC, VapD, VapE, VapF, VapG, VapH). Toutes les protéines codées par ces gènes ont une extrémité C-terminale similaire qui correspondrait soit à la zone

¹ L'ORF (Open Reading Frame) est une succession de codons qui ont du sens (donc sans codons stops) et traduit la présence d'une séquence codante (exon) dans la molécule d'ADN.

d'ancrage des protéines dans la membrane, soit à une zone antigénique commune pour ces sept protéines. Parmi les sept protéines, VapA est celle qui a été le plus étudiée ;

- Une région de conjugaison entre les ORF 23 et 40, qui serait impliquée dans les échanges de matériel génétique entre les différentes souches ;
- La dernière région entre les ORF 41 et 60 contiendrait l'origine de la réplication du plasmide (ORF 56) ainsi que les gènes impliqués dans la réplication du plasmide. Par ailleurs, cette région contient plusieurs gènes ayant une homologie marquée avec les systèmes de partition connus dans d'autres espèces bactériennes, qui assurent la transmission du matériel génétique aux cellules filles lors de la division cellulaire.

1.3.3.4.1. Régulation de l'expression des gènes du plasmide de virulence de *Rhodococcus equi*

L'expression des gènes associés aux 64 ORF du plasmide de virulence a été testée dans des cultures intra-macrophages et *in vitro* dans différentes conditions de température et de pH (REN & PRESCOTT, 2003). Dans les macrophages, l'ensemble des 7 gènes Vap présents sur l'îlot de pathogénicité sont exprimés ; il semblerait qu'aucun ORF hors de l'îlot de pathogénicité ne soit exprimé. Une température de culture à 37°C est nécessaire à l'expression des gènes du plasmide de virulence (REN & PRESCOTT, 2003) (LETEK *et al.*, 2010).

A 37°C, une carence en fer et en calcium, associée à un pH=5, favorisent l'expression des ORF 1,2, 5, 6-8, 12-15, 19, 20. Les ORF 3, 9 et 10 sont plus exprimés dans une culture à 37°C avec une carence en magnésium. La culture à une température de 37°C, un pH=5, dans un milieu carencé en fer, calcium et magnésium est la situation *in vitro* où l'expression des gènes du plasmide de virulence est la plus proche de celle observée dans les cultures dans les macrophages.

L'expression des gènes du plasmide de virulence régule positivement l'expression de deux gènes présents sur le chromosome de *Rhodococcus equi* codant des enzymes permettant la synthèse d'acides aminés aromatiques. Ces enzymes sont nécessaires pour la prolifération de la bactérie dans les macrophages (LETEK *et al.*, 2010).²

² L'acquisition de la virulence de *Rhodococcus equi* se serait faite par un mécanisme de cooptation : acquisition de quelques gènes qui régulent l'expression des gènes déjà présents dans le génome de la bactérie et modifient son interaction avec le milieu. Il est ainsi probable que l'acquisition du plasmide de virulence et du gène *rpl* codant pour une cyto-adhésine ait transformé une bactérie commensale en *Rhodococcus equi* pathogène (LETEK *et al.*, 2010).

2. Rhodococcose pulmonaire du poulain : étude clinique et épidémiologie

2.1. Prévalence

Les pneumonies à *Rhodococcus equi* sont une problématique à l'échelle mondiale et causent d'importantes pertes économiques pour les élevages principalement à cause du coût et de la longueur du traitement (MUSCATELLO, 2011a). Il n'y a à ce jour pas de preuve que les lésions induites par l'infection du poumon par *Rhodococcus equi* ne soient pas un frein à la carrière sportive des animaux.

Selon les élevages, l'apparition de pneumonies dues à *Rhodococcus equi* chaque année peut être sporadique ou endémique ; certains élevages ne rencontrent presque jamais de cas, tandis que d'autres ont tous les ans plusieurs poulains atteints. Dans un même élevage, le risque d'infection varie d'une année sur l'autre (CHAFFIN *et al.*, 2003a). Dans les élevages où l'infection est endémique, les taux d'infection varient en moyenne de 10 à 20% (COHEN *et al.*, 2008) (CHAFFIN *et al.*, 2003b), mais certains élevages très atteints peuvent avoir plus de 20% de cas. Il n'existe pas de prédisposition de sexe au développement d'une pneumonie à *Rhodococcus equi* chez les poulains (CHAFFIN *et al.*, 2003a).

Lors d'une étude comparative réalisée dans 32 élevages sains et 32 élevages contaminés au Texas en 2003 (CHAFFIN *et al.*, 2003b), 33 des 113 poulains (29,2%) nés dans des élevages atteints sont morts ou ont été euthanasiés à la suite d'une pneumonie à *Rhodococcus equi*, soit entre 0 et 4 poulains morts par élevage durant l'année 1997 (médiane de 1 poulain mort par élevage).

2.2. Etude clinique de la Rhodococcose du poulain

2.2.1. Forme pulmonaire

2.2.1.1. Présentation clinique

La forme pulmonaire de l'infection par *Rhodococcus equi* entraîne le plus souvent une pneumonie chronique associée à la formation d'abcès dans le parenchyme pulmonaire, ainsi qu'une lymphadénite suppurative.

Dans un premier temps, les lésions évoluent lentement et les poulains compensent la perte de fonction progressive du poumon. Les signes précoces de l'infection sont une légère augmentation de la fréquence respiratoire et une hyperthermie modérée, qui sont rarement observées (GIGUERE & PRESCOTT, 1997).

Lorsque les poulains déclarent la forme chronique de la maladie, sont retrouvés à l'examen clinique (GIGUERE & PRESCOTT, 1997) (COHEN *et al.*, 2005) :

- Hyperthermie (38,8-40,0°C jusqu'à 41,5°C) [94%],
- Toux [89%],
- Détresse respiratoire [80%] et tachypnée,
- Jetage purulent bilatéral [51%],
- Abattement,
- Baisse de l'appétit,
- Bruits anormaux à l'auscultation pulmonaire [86%], dont l'intensité n'est pas toujours corrélée à la sévérité des lésions,
- Amaigrissement lors d'atteinte sévère.

Plus rarement, lors de formes subaiguës, sont observées une :

- Détresse respiratoire aiguë,
- Mort en quelques jours malgré un traitement adapté.

Ces signes cliniques ne sont pas pathognomoniques d'une infection par *Rhodococcus equi* mais sont ceux d'une pneumonie suppurative, l'implication de *Rhodococcus equi* lors de pneumonie doit impérativement être confirmée à l'aide d'examens complémentaires.

2.2.1.2. Examens complémentaires décrits pour la confirmation du diagnostic de forme pulmonaire de *Rhodococcose*.

Les analyses de biochimie sanguine révèlent une hyperfibrinogénémie. Ce marqueur de l'inflammation serait un paramètre sensible dans la détection de la maladie et un critère pronostique : les poulains survivants auraient un taux de fibrinogène sanguin plus faible que ceux ne survivant pas.

La numération formule sanguine sur un poulain atteint de pneumonie due à *Rhodococcus equi* montre une leucocytose ($15-20 \times 10^9$ cellules/L) neutrophilique associée à une lymphopénie marquée ($<1,0 \times 10^9$ /L). Le suivi de la leucocytose est un indicateur relativement sensible et spécifique dans les cas précoces et avancés (MUSCATELLO, 2011b).

Les techniques d'imagerie médicale permettent de diagnostiquer l'apparition des lésions pulmonaires. Les radiographies thoraciques montrent des lésions nodulaires, cavitaires d'opacité liquidienne voire aérique, compatibles avec des abcès. Chez les poulains de moins de trois mois, ces lésions sont très spécifiques d'une bronchopneumonie à *Rhodococcus equi* ; chez des poulains de plus de 3 mois, ces lésions peuvent aussi être dues à une infection à *Streptococcus zooepidemicus* (GIGUERE & PRESCOTT, 1997). Il est aussi possible d'observer un déplacement dorsal de la trachée par des nodules de densité tissulaire indiquant une atteinte des nœuds lymphatiques trachéo-bronchiques ; ce dernier signe est un facteur pronostique négatif. Si la radiographie permet l'exploration de l'ensemble de l'épaisseur du parenchyme pulmonaire, elle ne permet pas de visualiser les lésions de petites tailles, au début du développement de la maladie.

L'échographie permet d'observer le bord thoracique des plèvres en glissant la sonde le long des espaces intercostaux. Cette technique permet uniquement de détecter les abcès en superficie du

poumon et ne permet pas de juger du degré d'atteinte de l'ensemble du parenchyme pulmonaire. L'échographie reste toutefois sensible pour la détection des formes subaiguë à chronique de rhodococcose pulmonaire et est parfois utilisée pour réaliser un dépistage systématique de la maladie dans des grands élevages fortement atteints. Lors de ces dépistages, le nombre et la taille des abcès observés permettent au clinicien de décider du traitement à prescrire en fonction de son expérience. L'avantage de ce dépistage est de permettre un traitement antibiotique plus précoce et moins long (MUSCATELLO, 2011a). Dans les élevages infectés, de nombreux poulains présentent des abcès visibles à l'échographie mais ne déclarent jamais de signes de détresse respiratoire et guérissent aussi rapidement, avec ou sans la mise en place d'un traitement antibiotique (VENNER *et al.*, 2012). Le traitement systématique des poulains à partir du dépistage échographique uniquement entraîne une surconsommation d'antibiotiques non compatible avec les règles actuelles de bonnes pratiques d'antibiothérapie (BURTON *et al.*, 2012). Il est important de noter que le traitement actuellement préconisé pour lutter contre *Rhodococcus equi* comprend de la rifampicine, antibiotique actif sur les germes intracellulaires et utilisé pour traiter les cas de tuberculose humaine, il est donc primordial de limiter l'apparition d'antibiorésistances contre cet antibiotique.

2.2.1.3. Lésions retrouvées à l'autopsie

L'étude rétrospective sur les poulains de plus de 24 heures autopsiés à l'ANSES-Dozulé entre 1986 et 2006 a montré que 119 poulains sur les 1 617 étudiés (7,4%) étaient morts de rhodococcose (MAUGER, 2009). Lors de forme pulmonaire, les lésions prédominantes sont :

- Des abcès disséminés dans le parenchyme, à pus crémeux ou caséeux (87,3%),
- Une densification dans le parenchyme au stade d'hépatisation rouge ou grise (68,8%),
- Une hypertrophie et une abcédation des nœuds lymphatiques trachéo-bronchiques (30,7%) et médiastinaux (15,3%).

2.2.2. Formes non pulmonaire

La majorité des poulains de moins de 6 mois présentant une pneumonie à *Rhodococcus equi* ont aussi des lésions extra-pulmonaires liées à ce germe (REUSS, CHAFFIN, & COHEN, 2009). Parmi ces formes extra-pulmonaires, nous pouvons distinguer les formes digestives, les atteintes consécutives à une bactériémie et les atteintes liées à la réaction immunitaire.

2.2.2.1. Forme digestive

La forme digestive de la Rhodococcose se caractérise par la présence de lésions d'entéocolite et d'abcédation des nœuds lymphatiques digestifs. Les signes cliniques chez les poulains sont très frustes (diarrhée, colique, retard de croissance) et très inconstants (REUSS *et al.*, 2009). La rupture d'abcès dans la cavité péritonéale peut aboutir à la mort des poulains par péritonite septique.

2.2.2.2. Autres formes décrites

Rhodococcus equi peut être la cause de troubles locomoteurs lorsqu'il cause une ostéomyélite, une arthrite septique. Lors d'atteinte spinale, il est possible d'observer une ataxie ou une parésie par perturbation de l'influx nerveux.

La migration de la bactérie peut aussi entraîner l'apparition d'abcès hépatiques ou rénaux, une pleurésie septique, une atteinte des nœuds lymphatiques médiastinaux, des abcès intracrâniens (REUSS *et al.*, 2009), ou bien des abcès cutanés.

2.2.2.3. Symptômes dus à un dysfonctionnement immunitaire

Certaines anémies hémolytiques, uvéites et polyarthrites à médiation immune ont été rapportées lors d'atteinte par *Rhodococcus equi*.

2.2.2.4. La rhodococcose chez les autres espèces

Rhodococcus equi a été isolé chez de nombreuses espèces, telles que les camélidés, les porcs, les bovins, les ovins, les caprins, les crocodiles, les chats et les chiens. Cependant, les poulains sont les seuls animaux chez qui la rhodococcose peut survenir sans trouble sous-jacent de l'immunité (GIGUERE *et al.*, 1999).

Chez l'Homme, *Rhodococcus equi* est un agent pathogène pour les personnes immunodéficientes, chez qui il provoque des bronchopneumonies (80%), des infections de plaies, péritonites, arthrites septiques, abcès hépatiques, infections urinaires... (WEINSOCK & ARTHUR, 2002)

2.3. Modes d'infection

Les poulains sont en contact dès les premières heures de leur vie avec *Rhodococcus equi* présent dans l'environnement, en particulier dans les fèces de leurs mères (GRIMM *et al.*, 2007). Il est donc difficile de dater précisément le début de l'infection.

Expérimentalement, l'administration intratrachéale de 10^4 UFC de *Rhodococcus equi* virulent chez le poulain entraîne l'apparition d'une pneumonie en 6 à 18 jours (WADA *et al.*, 1997). Cette période d'incubation ainsi que la répartition de l'âge des poulains atteints (de 3 semaines à 6 mois) conduisent à penser que l'infection par *Rhodococcus equi* intervient lors de la période de faiblesse immunitaire des poulains, après la disparition du taux protecteur d'anticorps maternels et avant l'acquisition d'un système immunitaire compétent par les jeunes animaux.

Actuellement il est admis que les formes pulmonaires de rhodococcose sont déclenchées par l'inhalation de *Rhodococcus equi* présent dans les poussières du sol en suspension dans l'air, principalement lorsque le climat est chaud et sec (MUSCATELLO, 2011a). Cependant il n'existe aucun consensus sur la quantité de bactéries inhalées nécessaire pour causer une infection pulmonaire. Les doses utilisées expérimentalement sont largement supérieures à celles retrouvées dans l'environnement et les infections expérimentales sont réalisées par une administration unique ; dans les élevages, les poulains inhalent de plus petites quantités de *Rhodococcus equi* mais de manière répétée, ce qui complique encore l'appréciation de la date de l'infection (MUSCATELLO, communication personnelle)

2.4. Réaction immunitaire contre *Rhodococcus equi*

La présence de souches virulentes dans l'intestin des poulains dès leur plus jeune âge (TAKAIS. *et al.*, 1986 a) apparaît comme une étape importante de l'acquisition de l'immunité contre *Rhodococcus equi* (CHIRINO-TREJO *et al.*, 1987). Les protéines VapA et VapC codées par des gènes présents sur le plasmide de virulence sont les plus immunogènes.

Chez les souris, la réaction immunitaire à médiation humorale (voie Th2) n'est pas protectrice contre l'infection à *Rhodococcus equi*; la réaction à médiation cellulaire (voie Th1) est suffisante pour assurer l'élimination de la bactérie dans le poumon.

Chez les poulains, les manifestations cliniques apparaissent principalement lorsque le titre en anticorps maternels décroît et avant l'acquisition d'un système immunitaire mature. La protection contre *Rhodococcus equi*, germe intracellulaire, doit faire intervenir les voies Th1 (immunité à médiation cellulaire) et Th2 (immunité à médiation humorale). La production d'IgA présentes sur les muqueuses, limite l'entrée de la bactérie dans l'organisme. Les IgG systémiques ont un rôle important dans l'opsonisation de la bactérie (CAUCHARD *et al.*, 2004). Les cellules intervenant dans la voie Th1 sont productrices d'interféron- γ (IFN- γ) et sont efficaces dans l'élimination de *Rhodococcus equi* virulent (GIGUERE *et al.*, 1999).

Expérimentalement l'orientation Th1/Th2 varie en fonction de la dose de bactéries inoculées, 10^8 UFC de *Rhodococcus equi* virulent conduisent à la mise en place d'une réaction à médiation humorale et au développement d'une pneumonie ; alors que 10^6 UFC entraînent une réaction à médiation cellulaire plus forte et une forme subclinique de la maladie (JACKS & GIGUERE, 2010).

L'orientation immunitaire est aussi fortement influencée par l'adjuvant injecté en même temps que les antigènes (CAUCHARD *et al.*, 2004).

2.5. Prophylaxie médicale, traitements et antibiorésistance

Il n'existe pas de vaccin possédant une AMM pour les pneumonies à *Rhodococcus equi*, cependant il est actuellement possible en France d'utiliser sur prescription vétérinaire des auto-vaccins à partir d'une souche tuée isolée dans l'élevage auquel sera destiné l'autovaccin. Afin d'assurer une immunité optimale, il est conseillé d'utiliser une souche issue des lésions d'un poulain malade.

L'utilisation des plasmas hyper-immuns est controversée (DAWSON *et al.*, 2010). Les plasmas hyper-immuns fournissent des anticorps, dont des anticorps spécifiques contre *Rhodococcus equi* si l'animal donneur est correctement immunisé contre la bactérie, ainsi que des facteurs de l'immunité (fibronectine, complément, cytokines). De nombreux facteurs peuvent causer une inefficacité du plasma tels que la perte de la virulence des souches utilisées pour l'immunisation des donneurs, des souches trop différentes de celles présentes dans l'élevage ou une mauvaise réponse immunitaire du donneur. L'utilisation du plasma ne semble pas conduire à une diminution de l'incidence de la maladie dans l'élevage, il est nécessaire d'y associer des mesures de gestion de l'effectif :

amélioration de la détection précoce des signes cliniques, diminution de la pression infectieuse dans l'environnement, séparation des animaux ayant reçu le plasma et de ceux n'en ayant pas reçu.

Les infections à *Rhodococcus equi* sont particulièrement difficiles à traiter du fait de l'inflammation pyogranulomateuse, de la localisation intracellulaire du germe associées à une résistance chromosomique à de nombreux antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, sulfamides, quinolones, tétracyclines, clindamycine et chloramphénicol). Les gènes responsables de cette antibiorésistance sont tous intégrés dans le génome chromosomal de *Rhodococcus equi* sans signes d'acquisition récentes ; prouvant que l'antibiorésistance n'est pas due à l'utilisation des antibiotiques dans le traitement des animaux malades mais a été acquise au cours de l'évolution de *Rhodococcus equi* comme pour de nombreuses autres bactéries environnementales (LETEK *et al.*, 2010).

Le traitement repose sur l'utilisation combinée de macrolides (érythromycine, tulathromycine, azithromycine, clarithromycine) et de rifampicine. Les doses utilisées pour la combinaison érythromycine / rifampicine sont :

- 25 mg/kg d'érythromycine *per os* toutes les 8 à 12 heures,
- 5 mg/kg de rifampicine *per os* toutes les 12 heures (ou 10 mg/kg PO toutes les 24 heures)

La potentialisation de l'effet de ces deux molécules permet d'éviter l'apparition de résistances à ces deux molécules. La mise en place de ce traitement peut entraîner l'apparition d'effets indésirables tels qu'une anorexie transitoire, de légères coliques et du bruxisme. L'érythromycine peut entraîner une légère diarrhée transitoire et une hyperthermie par un effet prokinétique chez le poulain ; l'apparition d'un tel syndrome de colique peut mettre en jeu le pronostic vital de l'animal à court terme et doit alerter le propriétaire et le vétérinaire. Suite à l'ingestion de faibles doses de principe actif par la mère (par coprophagie ou léchage du poulain), il a été observé l'apparition d'une diarrhée par perturbation de la flore intestinale (MUSCATELLO, 2011b). En raison de ces effets secondaires, d'autres macrolides sont aujourd'hui utilisés en association avec la rifampicine pour le traitement de la rhodococcose pulmonaire chez le poulain, tels que de l'azithromycine (10mg/kg une fois par jour) ou de la clarithromycine (7,5 mg/kg toutes les 12 heures).

2.6. Critères diagnostiques

2.6.1. Critères décrits dans la littérature permettant d'établir un diagnostic de certitude d'infection par *Rhodococcus equi*

Obtenir un diagnostic de certitude pour une infection par *Rhodococcus equi* se révèle souvent compliqué. En effet, il faut tenir compte de la présence normale de la bactérie dans l'environnement qui peut se retrouver dans le tractus respiratoire des poulains sans que ceux-ci ne soient malades. Lorsque nous objectivons des abcès dans les poumons d'un poulain par imagerie médicale, *Rhodococcus equi* n'est pas la seule cause possible de l'apparition de ces lésions. Il existe aussi une proportion variable de poulains infectés sub-cliniquement qui ne manifestent aucune difficulté respiratoire qui sont autant de « faux négatifs ».

En 2003, CHAFFIN *et al.* ont étudié les facteurs de risques d'infection par *Rhodococcus equi* liés aux poulains ; pour ce faire, il a proposé la méthode de diagnostic suivante (CHAFFIN *et al.*, 2003a) :

- Les poulains ont entre 3 semaines et 6 mois d'âge ;
- Ils présentent des signes cliniques de pneumonie (tachypnée, fièvre, jetage nasal ou toux) ;
- *Rhodococcus equi* a été isolé par aspiration trans-trachéale ou dans des abcès pulmonaires à l'autopsie ;
- Pour les animaux n'étant pas morts à la suite de la maladie, le diagnostic était posé si au moins deux des signes suivants étaient présents :
 - o Opacités multifocales sur les radiographies thoraciques,
 - o Présence d'abcès pulmonaires lors de l'échographie thoracique,
 - o Présence de coccobacilles Gram positif dans le liquide de lavage trans-trachéal.

En 2005, lors d'une étude épidémiologique au Texas, COHEN *et al.* définissent comme infectés les poulains de moins de quatre mois, ayant :

- Des signes cliniques de pneumonie et un isolement de *Rhodococcus equi* sur un liquide de lavage trans-trachéal ou dans des lésions prélevées en autopsie ;
- Ou bien des signes cliniques de pneumonies et au moins deux des signes suivants :
 - o Opacités multifocales sur les radiographies thoraciques,
 - o Présence d'abcès pulmonaires lors de l'échographie thoracique,
 - o Présence de coccobacilles Gram positif dans le liquide de lavage trans-trachéal,
 - o Une réponse positive au traitement spécifique contre *Rhodococcus equi*. L'auteur considérant que l'association macrolide et rifampicine est très spécifique de cette bactérie et n'agit pas sur les autres bactéries pouvant causer des pneumonies abcédatives.

Nous pouvons noter que dans ces deux études, il n'est pas fait mention des dosages d'anticorps spécifiques contre *Rhodococcus equi*. La bactérie étant présente dans l'environnement, il est normal que les poulains développent une immunité. Ces études n'utilisent pas non plus la détermination de la virulence de la souche par PCR (recherche du gène *Vap A*).

2.6.2. Critères utilisés par les vétérinaires de Basse-Normandie pour établir le diagnostic d'infection par *Rhodococcus equi*

Lors de l'étude sur la rhodococcose équine en Basse-Normandie menée en 2005 (TAPPREST *et al.*, 2012), les auteurs ont envoyé un questionnaire aux vétérinaires équins de la région afin de connaître les critères usuellement retenus dans la démarche diagnostique lors d'une suspicion de pneumonie à *Rhodococcus equi*. Sur les 46 vétérinaires équins de la région contactés, 35 ont répondu soit, un taux de réponse de 76 %.

Tableau 1 : Fréquence d'utilisation des critères diagnostiques usuellement décrits dans la littérature pour la confirmation d'une suspicion de pneumonie due à *Rhodococcus equi* par les vétérinaires Bas-Normands ayant répondu à l'étude de 2005 (TAPPREST *et al.*, 2012) :

% modalités diagnostiques rhodococcose	Toujours	Parfois	Jamais
<u>Critères épidémiologiques</u>			
Elevage « endémique »	71,4	28,6	0
Densité	50	28,6	21,4
Distribution de l'alimentation	14,3	4,1	78,6
Période de l'année	42,8	42,8	14,3
Age du poulain	50	35,7	14,3
<u>Critères cliniques</u>			
Faiblesse	43,1	38,5	15,4
Baisse d'état	23,1	53,8	23,1
Hyperthermie	61,5	30,8	7,69
<u>Fonction respiratoire</u>			
Toux	76,9	15,4	7,69
Jetage nasal	23,1	15,4	61,5
Tachypnée	76,9	7,69	7,69
Dyspnée	53,8	15,4	30,8
Auscultation pulmonaire	76,9	15,4	7,69
Percussion thoracique	0	7,69	92,3
<u>Boiterie</u>	7,69	69,2	15,4
<u>Diarrhée chronique</u>	0	69,2	30,8
<u>Uvéite</u>	0	15,4	84,6
<u>Examens sanguins</u>			
Numération Formule	57,1	28,6	14,3
Fibrinogène	64,3	14,3	21,4
Sérologie	14,3	71,4	14,3
<u>Examens bactériologiques</u>			
Sur écouv. nasal	0	14,3	64,3
Sur lav. Trachéal	14,3	28,6	64,1
Coprologie	0	28,6	71,4
<u>Imagerie</u>			
Radiographie	0	42,9	57,1
Echographie	7,1	14,3	78,6
<u>Réponse au traitement</u>	0	71,4	28,6

Dans l'ensemble, les vétérinaires de la région sont sensibles aux critères épidémiologiques renforçant la suspicion d'infection par *Rhodococcus equi* (cf. Tableau 1), 48 % à 71 % les utilisent systématiquement. Ceci renforce l'intérêt de notre étude afin de proposer des facteurs de risque adaptés à la situation de la maladie dans la région. De même les vétérinaires sont très sensibles aux signes de pneumonie lors de l'examen clinique des animaux suspects ; cependant ces signes cliniques

ne sont absolument pas pathognomoniques des pneumonies dues à *Rhodococcus equi*, il est donc nécessaire de nous intéresser aux examens complémentaires réalisés.

La numération/formule évoquée précédemment est assez souvent réalisée (une majorité des vétérinaires l'utilisent systématiquement) et plus encore la mesure du fibrinogène. Une leucocytose neutrophilique et lymphopénique associée à une hyperfibrinogénémie marquée sont des résultats très évocateurs de la maladie (GIGUERE & PRESCOTT, 1997), fréquemment utilisés comme critères d'atteinte dans les études épidémiologiques menées.

Les examens bactériologiques sont rarement réalisés, *Rhodococcus equi* étant une bactérie ubiquiste dont toutes les souches ne sont pas pathogènes, il est possible de la retrouver dans l'appareil respiratoire des poulains sans que ceux-ci ne déclarent la maladie. Le rapport bénéfice/risque des lavages trans-trachéaux n'est donc pas très intéressant pour le diagnostic de la maladie.

Enfin, les vétérinaires de la région utilisent très peu les examens d'imagerie médicale (radiographie et échographie). Ceci est certainement dû à la difficulté de mise en œuvre et au coût de ces examens complémentaires. En effet la réalisation d'un cliché radiographique nécessite la possession d'un générateur très puissant et d'installations que peu de cliniques possédaient en 2005 dans la région. Concernant l'échographie, elle est très peu utilisée, pourtant la Basse-Normandie étant une région d'élevage, la majorité des vétérinaires exerçant en équine possèdent un échographe pour le suivi de reproduction. L'examen échographique du poumon se limite à l'examen de la surface costale de l'organe (les ultrasons ne pénétrant pas dans le parenchyme à cause de l'air qui s'y trouve), à une profondeur qu'une sonde linéaire d'une fréquence de 7,5 MHz (sonde usuellement utilisée en gynécologie) pourrait atteindre.

Comme nous l'avons vu, *Rhodococcus equi* est initialement un germe de l'environnement qui a acquis un pouvoir pathogène chez les jeunes poulains. Cette bactérie se retrouve dans tous les élevages mais seulement certains présentent des poulains atteints chaque année. Nous allons maintenant étudier les facteurs de risque de développement de rhodococcose pulmonaire dans les élevages.

2.7. Facteurs de risque

Plusieurs études épidémiologiques ont été menées dans des régions d'élevages de différents pays, cherchant à mettre en évidence les facteurs de risques pouvant expliquer les différences dans la répartition inégale de la prévalence de la maladie selon les élevages.

2.7.1. Facteurs de risques liés à la composition de l'élevage

Tableau 2 : Tableau synthétisant les études menées concernant les indicateurs de risque de développer la maladie en fonction de la composition des élevages atteints ou sains. "+" traduit que l'indicateur est positivement corrélé avec la présence de la maladie; "0" traduit que l'indicateur n'est pas corrélé avec la maladie ; "-" traduit que l'indicateur est négativement corrélé avec la présence de la maladie ; "*" traduit que l'association est statistiquement significative ;

Facteurs de Risque étudiés Liés à la composition de l'élevage	USA 2005 (COHEN <i>et al.</i> , 2005)	Kentucky 2008 (COHEN <i>et al.</i> , 2008)	Texas 2003 (CHAFFIN <i>et al.</i> , 2003a) (CHAFFIN <i>et al.</i> , 2003b)	Normandie 2004 (TAPPREST <i>et al.</i> , 2012)
Superficie du haras pour élevage	+	0	+	0
Nombre de chevaux sur l'élevage	+	+	+	0 (pour résidents)
Nombre de poulains sur l'élevage	+	+	+	+
Ratio personnel/poulinière faible	/	/	/	+
Densité	0	+	0	+
Densité des poulains	0	+	+	+
Nombre de poulinières résidentes	+	+	+	0
Nombre de poulinières en transit	+	+	+	+
Présence de poulinières en transit	0	/	+	+
Ratio poulinières résidentes/transit	0	/	-	/
Partage d'installations res/transit	/	/	/	+
Date fondation élevage ancienne	/	0	0	-
Bonne qualité de l'environnement	/	/	/	-
Environnement poussiéreux	+	/	/	+
Limitation de la qté de poussières	0	/	/	/
Paddocks avec sol peu enherbé	+	/	/	+
Ventilation correcte box poulains	0	/	/	/
Fumière proche bâtiments élevages	/	/	/	+

2.7.1.1. Influence de la superficie et de la densité des animaux dans l'élevage

Dans les études analytiques précédemment réalisées (CHAFFIN *et al.*, 2003b) (COHEN *et al.*, 2005), la proportion d'élevages infectés de manière enzootique chaque année est significativement plus grande parmi les élevages de grande superficie que parmi les élevage plus petits. Dans l'étude réalisée en Basse-Normandie (TAPPREST *et al.*, 2012), la superficie des pâtures n'était pas différente entre les élevages atteints et les élevages sains.

Les études réalisées au Texas (CHAFFIN *et al.*, 2003b) mettent en évidence que les élevages dans lesquels chaque année naissent plus de 17 poulains sont significativement plus à risque de voir apparaître des cas de rhodococcose. En Basse-Normandie (TAPPREST *et al.*, 2012), nous retrouvons que les élevages de plus de 15 naissances par an sont plus fréquemment atteints.

La densité dans les élevages est calculée en divisant le nombre de chevaux par la superficie sur laquelle ils se trouvent. Cette donnée nous informe sur les contacts entre les animaux. Dans une étude menée au Texas (CHAFFIN *et al.*, 2003b), il apparait que la forte densité de poulains est plus significativement liée à la présence de la maladie que ne l'est la densité en chevaux de manière générale.

Plusieurs paramètres peuvent expliquer ce résultat. D'une part les poulains étant la population sensible, plus le nombre de poulains augmente plus les risques d'observer des animaux malades augmentent. Par ailleurs, les poulains excrètent dans l'environnement de grandes quantités de *Rhodococcus equi* par leurs fèces (poulains sains et atteints) et dans l'air expiré par les poulains atteints (MUSCATELLO *et al.*, 2007). Cette excrétion de *Rhodococcus equi* en grande quantité par les poulains entraîne un relargage massif dans l'environnement ainsi qu'une source potentielle d'infection.

2.7.2. Influence de la surcharge de travail et du contact avec des animaux extérieurs à l'élevage

Dans l'étude menée en Basse-Normandie (TAPPREST *et al.*, 2012), les auteurs ont apparié les élevages sondés en fonction du nombre de naissances par année ; après avoir établi quatre classes de nombre de naissances annuel ([0-4], [5-9], [10-14], [≥15]) ils ont recruté les élevages afin d'avoir la même proportion d'élevages sains et atteints dans chaque classe. Ceci leur a permis d'étudier les autres critères sans que leurs observations ne soient biaisées par la taille des élevages.

Il apparaît alors que le facteur « élevage en surpopulation » apprécié subjectivement par l'éleveur sur la base de la charge de travail, du logement disponible et de la superficie de son élevage par rapport au nombre de chevaux hébergés a plus d'influence sur l'apparition de la maladie que le nombre de chevaux sur l'élevage. Ceci peut s'expliquer par le fait que la surcharge de travail peut entraîner des défauts dans la prévention de la transmission indirecte de la maladie, facteur trop souvent oublié du fait du caractère faiblement contagieux des pneumonies à *Rhodococcus equi* (COHEN *et al.*, 2005).

La présence de juments et de leur poulain en transit dans les élevages et le partage des installations (gynécologie, camion de transport) augmentent aussi le risque d'observer des cas dans les élevages (CHAFFIN *et al.*, 2003b) (TAPPREST *et al.*, 2012).

2.7.2.1. Influence de la qualité de l'environnement et de la maîtrise sanitaire de l'élevage

La présence de poussières dans l'environnement des poulains augmente le risque de voir apparaître des cas dans l'élevage, en particulier quand ils évoluent dans des paddocks avec une faible couverture d'herbe (COHEN *et al.*, 2005) (TAPPREST *et al.*, 2012).

Lors des suivis de reproduction, les juments sont le plus souvent emmenées dans un local dédié comprenant un système de contention adapté pour permettre la réalisation des échographies, le plus souvent les juments sont alors accompagnées de leur jeune poulain. Lorsque l'aire sur laquelle ils patientent est poussiéreuse, le risque d'observer des cas de rhodococcose dans l'élevage est plus élevé (TAPPREST *et al.*, 2012).

La présence accrue de poussières dans les zones de vie des poulains entraîne certainement une plus forte exposition à *Rhodococcus equi*. Nous retiendrons donc qu'il est nécessaire de prendre en compte dans notre étude les facteurs concernant la gestion des sources d'infection possibles :

- Infection directe (présence d'animaux en transit, pas de quarantaine, mélange d'animaux de l'élevage et d'animaux en transit, augmentation de la densité en animaux sur les paddocks et les champs...) ;
- Infection indirecte (partage des installations et du matériel, absence de personnel dédié au soin des animaux en transit, contamination du sol par le jetage des poulains atteints et par les fèces des jeunes poulains, présence de poussières dans l'environnement des poulains...).

Les facteurs de risques étudiés liés à la composition des élevages nécessitent d'être approfondis, nous allons donc nous intéresser maintenant aux facteurs de risques de développement de la maladie relevant de la conduite de l'élevage.

2.7.3. Facteurs liés à la conduite d'élevage et à la gestion de la reproduction

Nous regroupons sous la dénomination « conduite d'élevage » l'ensemble des règles mises en place par l'éleveur régissant le mode de vie des animaux qu'il élève.

La naissance au pré est usuellement reconnue comme facteur limitant les risques de contamination des jeunes poulains, cela semble confirmé par l'étude à grande échelle menée aux USA (COHEN *et al.*, 2005).

La durée de gestation, l'âge et la parité de la mère ne semblent pas prédisposer ou protéger significativement de l'apparition d'une pneumonie due à *Rhodococcus equi*. En revanche, la présence de poulains nés tardivement (en mai-juin) semble prédisposer à l'apparition de cas dans les haras (TAPPREST *et al.*, 2012), ces poulains nés tardivement sont mis dans les paddocks et les champs à la belle saison quand les conditions météorologiques sont les plus favorables à l'aérosolisation de *Rhodococcus equi*.

Globalement la qualité du transfert d'immunité passive au poulain lors de sa naissance (qualité du colostrum de la mère, « bonne » prise du colostrum par le poulain, administration de colostrum du commerce, dosage des Ig dans le sang du poulain) ne semble pas protéger de l'apparition de la maladie (CHAFFIN *et al.*, 2003a). Cependant, cette étude avait été menée sur 220 poulains mais dans uniquement 2 élevages différents, vu l'importance du facteur « élevage » dans le développement de la maladie, et sachant que l'apparition des signes de l'infection correspond à la période où les anticorps maternels dans le sang diminue avant l'acquisition de l'immunité du poulain, nous abordons ce résultat avec prudence.

Il apparaît que des mesures visant à limiter la contamination de l'environnement (retrait des crottins, programmes de vermifugation fréquente) ou à améliorer la santé des poulains (surveillance accrue du poulinage, test de l'efficacité de l'immunité passive, transfusion de plasma hyper-immun) sont corrélées positivement avec l'infection des poulains. Une explication possible à ce résultat serait que les haras de grande taille (qui sont significativement plus atteints que les autres) sont aussi plus

techniques ; d'autre part, certaines de ces mesures correspondent aux recommandations actuellement conseillées pour limiter la progression des infections à *Rhodococcus equi*. Dans notre étude, il conviendra donc de tenter de s'affranchir de l'influence du facteur « haras de grande taille », mais aussi de savoir si les mesures d'amélioration de l'environnement des poulains ont été mises en place depuis la création de l'élevage ou suite aux premiers cas de rhodococcose équine.

Tableau 3 : Tableau synthétisant les études menées concernant les indicateurs de risque de développer la maladie en fonction de la conduite d'élevage dans les élevages atteints ou sains. "+" traduit que l'indicateur est positivement corrélé avec la présence de la maladie; "0" traduit que l'indicateur n'est pas corrélé avec la maladie ; "-" traduit que l'indicateur est négativement corrélé avec la présence de la maladie ; "*" traduit que l'association est statistiquement significative ;

Facteurs de Risque étudiés Liés à la conduite d'élevage	USA 2005 (COHEN <i>et al.</i> , 2005)	Kentucky 2008 (COHEN <i>et al.</i> , 2008)	Texas 2003 (CHAFFIN <i>et al.</i> , 2003a) (CHAFFIN <i>et al.</i> , 2003b)	Normandie 2004 (TAPPREST <i>et al.</i> , 2012).
Âge de la mère	0	/	0	/
Durée de gestation	/	/	0	/
Mère dans l'élevage depuis plus d'1 an	/	/	+	/
Parité >4	/	/	+	/
Historique de poulain atteint	/	/	0	/
Naissance tardive	/	/		+
Poulinage				
Poulinage au pré	-*	/	/	/
Poulinage dans un box de poulinage	0	/	/	/
Poulinage dans un autre haras	+	/	+	/
Surveillance accrue du poulinage	+	/	0	/
Accès à l'extérieur avant 2 semaines	0	/	+	/
Poulains restant plus tard au box	+	0	+	/
Séparation des « couples³ »	0	/	0	-(risque augmente en stabu)
Groupes ≤5 « couples » dans paddock	/	/	-	/
Groupes >5 « couples » dans paddock	/	/	+	/
Sevrage tardif (>5 mois)	+	/	- (f° conditions)	/
Poulains avec accès autres élevages	+	/	0 ⁴	+
Prophylaxie médicale				
Test transfert immunité passive	+	/	0	-*
Transfusion plasma hyperimmun	+	/	-	Trop peu réalisé
Administration anthelmintique fréquente	+	/	/	/
Programme de retrait des crottins	+	/	/	/
Utilisation des crottins comme engrais	0	/	/	/

³ Nous appellerons couple l'association d'une poulinière et de son poulain, ceux-ci sont très peu souvent séparés entre la naissance et le sevrage.

⁴ Dans cette étude le fait que les poulains voyagent dans d'autres élevages (sains ou présentant des cas de rhodococcose pulmonaire) ne semble pas être corrélé avec le statut du haras d'origine.

2.8. Exposition dans l'environnement

Rhodococcus equi est présent dans les sols et il est admis que l'infection se fait par inhalation de souches virulentes de la bactérie mises en suspension dans l'air avec les poussières. Nous allons donc étudier l'importance de la présence de la bactérie dans le sol et dans l'air dans les haras sains et contaminés.

2.8.1. Influence de la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol

Tous les chevaux sont porteurs de *Rhodococcus equi* dans leur tube digestif (TAKAI *et al.*, 1995) et il a été montré que la bactérie se multiplie plus vite dans des sols enrichis en matières fécales (HUGHES & SULAIMAN, 1987). L'élevage plus ou moins intensif sur les terres d'un haras conduit donc très vraisemblablement à une accumulation de *Rhodococcus equi* dans les sols.

Par ailleurs, une thèse récente (PHILIPOT, 2012) a montré que la bactérie virulente peut se retrouver à 50 cm de profondeur dans les champs et les paddocks de haras contaminés ou non. Dans une étude canadienne, sur 5 élevages, il a été mis en évidence une corrélation positive entre la contamination en *Rhodococcus equi* dans les sols des paddocks, des champs et des boxes et le temps depuis lequel le haras est utilisé pour l'élevage de chevaux. Le sol apparaît donc comme un réservoir important de la bactérie en particulier pour les sols sur lesquels ont évolué des poulains.

Récemment, plusieurs études ont été menées en Australie (MUSCATELLO *et al.*, 2006) et au Texas (MARTENS, *et al.*, 2000) afin de comprendre le rôle du sol comme réservoir et source de contamination pour les poulains. La comparaison des concentrations en *Rhodococcus equi* et *Rhodococcus equi* virulent retrouvées dans le sol montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les haras sains et les haras contaminés contrairement à ce qui était admis jusque-là (TAKAI, 1997).

Il n'y a pas de différence significative concernant la composition physico-chimique du sol entre les haras sains et les haras présentant régulièrement des cas de rhodococcose (MARTENS *et al.*, 2002).

2.8.2. Influence de la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air

Il est admis que le développement de pneumonies dues à *Rhodococcus equi* chez les jeunes poulains est très probablement lié à l'inhalation de la bactérie en aérosols dans les poussières de l'air environnant ; il est donc intéressant d'étudier la présence de *Rhodococcus equi* dans l'air qui peut être inhalé par les poulains.

La première étude recherchant la bactérie dans l'air de haras sains et contaminés, a été menée en Australie (MUSCATELLO *et al.*, 2006). Les prélèvements d'air ont été réalisés sur deux années consécutives et dans deux régions du Sud-Est de l'Australie : en 2000 dans 6 élevages et en 2001 dans les mêmes élevages et 18 autres. Les auteurs ont réalisé les prélèvements aux endroits usuellement décrits comme favorables à l'infection des poulains : les paddocks, les allées, les zones de contention ; ce sont tous des endroits poussiéreux avec peu d'herbe où les poulains sont regroupés. La concentration de *Rhodococcus equi* virulent (>1UFC/1000L), ainsi que la proportion de

souches virulentes récoltées dans l'air (>35%) sont significativement associées aux élevages dans lesquels la prévalence de la maladie est la plus forte. Les auteurs ont noté une forte variabilité de la concentration de bactéries retrouvées en fonction du jour de prélèvement et du climat.

Lors d'une étude menée dans un pays avec un climat proche de celui de la Basse-Normandie, en Irlande (MUSCATELLO *et al.*, 2006), les auteurs ont recherché la bactérie dans des prélèvements d'air dans trois fermes ayant au moins 15% d'incidence de pneumonies dues à *Rhodococcus equi* chez les poulains les années précédant l'étude. Les prélèvements étaient réalisés une fois par mois entre Juin et Août 2003, dans 2 box et 4 à 6 paddocks hébergeant des jeunes poulains choisis au hasard dans chaque élevage. *Rhodococcus equi* virulent (possédant le gène codant pour la lipoprotéine VapA) est détecté dans les box et dans les paddocks de chacun des élevages, la bactérie (toutes souches et souches virulentes) est toutefois retrouvée plus souvent et en plus grandes concentrations dans les box que dans les paddocks. Les concentrations médianes détectées dans l'air sont regroupées dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Concentrations médianes de *Rhodococcus equi* et *Rhodococcus equi* virulent recueillies dans les haras en Irlande en Juin, Juillet et Août 2003 (MUSCATELLO *et al.*, 2006).

Concentrations médianes	<i>R. equi</i> total	<i>R. equi</i> virulent
Box	5,0 – 10,5 UFC/1000L	0,7 – 2,5 UFC/1000L
Paddock	0 UFC/1000L	0 UFC/1000L

Dans cette même étude, *Rhodococcus equi* virulent est significativement plus souvent isolé dans les paddocks que dans les box. La présence de faibles concentrations de bactéries dans les prélèvements d'air à l'extérieur peut être imputée au climat humide de la région, moins favorable à la mise en suspension des aérosols, mais les auteurs n'indiquent pas de données concernant la météo lors des prélèvements ni sur la quantité de poussières dans l'environnement des poulains.

Après avoir étudié les données actuelles de la littérature sur la rhodococcose pulmonaire des poulains, nous allons présenter la mise en place de l'étude menée pendant l'été 2012 dans des haras de Basse-Normandie afin d'explorer les relations entre la quantité de *Rhodococcus equi* dans l'environnement des poulains et la présence de cas dans les élevages.

3. Matériel et méthodes de l'étude épidémiologique

3.1. Objectifs de l'étude

Le but de notre étude est de comparer la concentration de la bactérie dans l'air entre les haras indemnes de cas de rhodococcose et les haras enzootiques. Nous allons plus particulièrement rechercher la bactérie dans l'environnement des poulains, c'est-à-dire dans les boxes, les paddocks et les champs où ils sont hébergés durant les six premiers mois de leur vie.

Le box est un local dédié au logement d'un cheval ou d'une poulinière et de son poulain. Le sol du box est recouvert de litière, telle que de la paille ou des copeaux de bois. Le paddock est une surface extérieure close destinée à accueillir un nombre restreint de chevaux pour leur permettre de se détendre ou comme zone d'attente. Le sol du paddock est généralement constitué d'herbe ou de sable ; dans les paddocks initialement en herbe, il est fréquent que la présence d'animaux sur cette petite surface entraîne la disparition plus ou moins étendue de la couverture végétale. Enfin, les champs sont utilisés pour sortir plusieurs chevaux et leur permettre de se nourrir.

En général, les poulains passent les premiers jours de leur vie dans le box avec leur mère, puis sortent quelques heures par jour dans les paddocks. Ensuite, les poulinières suitées sortent en groupe dans les champs.

Tout d'abord nous allons définir les élevages que nous allons étudier, l'objectif est d'obtenir deux lots d'élevages, un lot témoin et un lot atteint entre lesquels nous pourrions comparer la concentration de *Rhodococcus equi* retrouvé dans l'air. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans les haras atteints à ceux obtenus dans les haras témoins, nous devons nous affranchir des autres facteurs de risque précédemment décrits en particulier la taille des élevages et les conditions météorologiques le jour du prélèvement.

3.2. Recrutement des élevages

3.2.1. Classement des élevages indemnes (témoins) / enzootiques (atteints)

La première étape de notre enquête est de déterminer comment nous définissons le statut indemne (témoin) ou enzootique (atteint) des élevages.

Dans l'objectif de ne pas recruter de faux positifs dans le lot des élevages atteints, nous considérons comme atteint un élevage dans lequel au moins un poulain mort de rhodococcose pulmonaire a été autopsié à l'ANSES-Dozulé entre les années 2005 à 2012 (avec examen bactériologique des lésions pulmonaires confirmant l'implication de *Rhodococcus equi*).

De la même manière, afin de ne pas recruter de faux négatifs parmi les élevages sains, nous éliminerons tous les élevages pour lesquels le vétérinaire référent ou l'éleveur nous auront rapporté des suspicions d'infection par *Rhodococcus equi* entre les années 2005 à 2012.

Concernant les cas survenant pendant l'année de notre étude, d'après les connaissances cliniques et les méthodes de diagnostic utilisées en Basse-Normandie, nous choisirons de considérer comme atteint les poulains présentant les signes cliniques d'une bronchopneumonie (hyperthermie, toux, tachypnée, dyspnée) et :

- Soit un isolement de *Rhodococcus equi* sur liquide de lavage trachéal ou sur un échantillon de tissu pulmonaire à l'autopsie ;
- Soit 2 résultats positifs dans la liste des examens complémentaires ci-dessous :
 - Opacités nodulaires multifocales dans le parenchyme pulmonaire à la radiographie,
 - Visualisation d'abcès pulmonaires par échographie des poumons,
 - Hyperfibrinogénémie couplée à une leucocytose neutrophilique,
 - Amélioration clinique suite à la mise en place d'un traitement antibiotique spécifique de *Rhodococcus equi*.

Nous avons défini les élevages dans notre étude de la manière suivante :

- **Elevage atteint:** Elevage pour lequel au moins un poulain mort de rhodococcose pulmonaire a été autopsié à l'ANSES-Dozulé entre 2005 et 2011 (données Archives ANSES-Dozulé) ;
- **Elevage témoin :** Elevage pour lequel aucun cas de rhodococcose (forme pulmonaire ou autre) n'a été rapporté par le vétérinaire référent ou par l'éleveur depuis 2005. Nous éliminerons le cas échéant les élevages pour lesquels un cas serait survenu au cours de l'année de déroulement de l'étude (2012).

3.2.2. Mode de recrutement

Connaissant les critères nous permettant d'inclure un élevage dans le lot témoin ou dans le lot atteint, nous allons maintenant définir le mode de recrutement qui nous permettra de constituer deux lots dans lesquels nous pourrions comparer les concentrations de *Rhodococcus equi* dans l'environnement en éliminant les biais.

L'augmentation du nombre de naissances dans l'élevage est significativement associée à la présence de la maladie. Nous avons donc construit notre échantillon de manière à éliminer les biais liés à la taille de l'élevage. Pour cela nous ne sélectionnons que des élevages présentant plus de 15 naissances par an depuis 2008 (données SIRE) (seuil au-delà duquel la maladie est significativement plus présente dans la région (TAPPREST *et al.*, 2012) et pour lesquels au moins 15 juments doivent pouliner dans le haras en 2012.

A partir de la base de données obtenue grâce à une extraction de la base de données SIRE (Système d'Identification Répertoire des Equidés), nous sélectionnons les élevages avec plus de 15 naissances par an depuis 2008. A l'aide des archives des autopsies réalisées à l'ANSES-Dozulé entre 2005 et 2012, nous classons ensuite les élevages sains et atteints selon les critères retenus (cf. *supra*). Dans chacune des deux listes ainsi obtenues (30 atteints et 113 sains) et afin d'obtenir un échantillon représentatif, nous effectuons un tirage au sort, déterminant l'ordre dans lequel nous allons contacter les haras.

3.2.2.1. *Contact avec les vétérinaires*

Ayant obtenu la liste ordonnée de manière aléatoire des haras témoins et des haras présentant des cas de rhodococcose, nous avons recherché dans la base de données des rapports des autopsies réalisées à l'ANSES-Dozulé le nom du dernier vétérinaire nous ayant envoyé une demande d'autopsie pour chaque élevage. Nous avons éliminé les élevages pour lesquels aucune correspondance n'a pu être trouvée (8 élevages parmi les 40 premiers de la liste des élevages présumés sains, aucun des haras atteints). Nous avons ensuite contacté les vétérinaires correspondants avant de commencer à contacter les haras afin de leur présenter les objectifs et les modalités de notre étude.

Nous leur avons ensuite demandé s'ils étaient toujours vétérinaires traitants dans ce(s) haras et s'ils voyaient un inconvénient à ce que nous contactions l'éleveur pour lui proposer de venir réaliser nos prélèvements chez lui.

Enfin, nous avons demandé au vétérinaire s'il avait rencontré des cas de rhodococcose (quelle que soit la forme) dans les dernières années afin de vérifier que notre classement de l'élevage était toujours valable.

Afin de standardiser notre discours auprès des vétérinaires, nous avons utilisé une fiche « appel vétérinaire » (Annexe 4 : Guide pour les appels aux vétérinaires traitants).

3.2.2.2. *Contact avec les éleveurs*

Après avoir contacté les vétérinaires, nous avons téléphoné aux éleveurs dans l'ordre de la liste tirée au sort.

Les élevages présumés sains et ceux présumés atteints ont été contactés par deux enquêteurs différents. Les élevages présumés atteints, dont au moins un poulain mort de rhodococcose a été autopsié à l'ANSES-Dozulé, ont été contactés par une personne en charge des autopsies au laboratoire, maîtrisant la communication avec ces éleveurs. Les élevages présumés sains ont été contactés par une autre personne afin de diminuer la charge de travail pour la personne en charge de la communication avec les haras présumés atteints.

Le contact téléphonique nous a permis de présenter les objectifs de l'étude et les différents prélèvements que nous effectuerions. Concernant les prélèvements d'air, nous avons insisté sur les mesures de sécurité que nous prenons pour nous assurer que la jument portant le dispositif s'y habitue (cf. Annexe 1 : Guide pour les appels aux éleveurs). Au cours de la discussion, nous avons redemandé aux éleveurs s'ils avaient des cas de rhodococcose

Après avoir reçu un premier accord oral pour la participation à l'étude, nous avons envoyé une lettre résumant le déroulement des prélèvements ainsi qu'un formulaire nous permettant de prévoir notre passage dans les élevages (Annexe 1 : Guide pour les appels aux éleveurs).

Nous avons sélectionné les 20 premiers haras atteints et les 8 premiers haras sains ayant accepté de participer à l'étude. Le nombre de haras dans les deux lots a été calculé avec le Dr Michel

HENRY-AMAR⁵ à partir de l'étude ayant conduit à la mise au point de la méthode de prélèvement d'air et des résultats obtenus dans un haras atteint et un haras témoin (PHILIPOT, 2012). Cette répartition nous permettait d'obtenir une puissance statistique suffisante pour comparer les deux lots en tenant compte des résultats de l'année précédente auxquels nous avons rajouté une marge d'erreur.

3.2.3. Choix de la date de visite dans les élevages

Notre objectif est de nous déplacer quand les conditions météorologiques sont les plus favorables à l'infection des poulains et à l'aérosolisation de *Rhodococcus equi*, c'est-à-dire quand le niveau de poussière est maximal. Afin de cerner correctement les meilleurs jours de prélèvement, nous avons demandé l'aide de l'association régionale de surveillance de la qualité de l'air (Air COM). Nous avons alors fixé qu'il ne fallait pas qu'il ait plu sur le haras les deux jours précédant notre passage, ni pendant la journée de prélèvements. D'après leur expertise, les conditions permettant un assèchement le plus rapide du sol en Basse-Normandie sont des vents de secteur Nord-Est à Sud, ce qui correspond à une période de beau temps sec dans la région. Nous consultons les prévisions de charge de poussière dans l'air à 24 et 48 heures, sur leur site Internet (www.air-com.asso.fr) avant de contacter les éleveurs. Nous ne nous déplaçons que si les prévisions indiquaient une qualité de l'air « très bonne » ou « bonne ».

De plus, avant de nous déplacer dans les haras, nous avons suivi la météo par Internet (sites : www.meteofrance.com et www.meteo-normandie.fr) afin de nous assurer qu'il n'avait pas plu les 2 jours précédant notre passage dans l'élevage et qu'il ne pleuvrait pas au moment de nos mesures. Par ailleurs, en prenant rendez-vous par téléphone la veille ou l'avant-veille de notre passage, nous demandons à l'éleveur si le sol des paddocks et des champs accueillant de jeunes poulains sont secs.

Au début de chaque prélèvement d'air en extérieur (environ 20 minutes après le démarrage du CIP, le temps de nous assurer que la jument tolérât correctement le dispositif), nous nous positionnons au point le plus ensoleillé de la zone de prélèvement afin de relever les données climatiques suivantes : la vitesse maximale du vent, la température ambiante et l'humidité de l'air. Dans les box, le relevé des conditions météorologiques se faisait à 1m70 du sol, à l'intérieur du box à 1m50 de la porte d'entrée. Ces trois paramètres nous permettent d'avoir une estimation indirecte de la mise en suspension potentielle des poussières du sol dans l'air. Pour compléter ces informations, nous notons aussi l'état du sol dans les différentes surfaces de prélèvement (*cf. infra*).

Le choix de la date de notre passage dans les élevages se fait donc en fonction des disponibilités des éleveurs et de la météo. Notre objectif est de visiter 20 haras atteints et 8 haras sains. Nous avons donc décidé de réaliser des grappes comprenant 2 à 3 haras atteints pour un haras sain.

⁵ Le Dr Michel HENRY-AMAR est le médecin responsable du Centre de Traitement des Données au centre de lutte contre le cancer François Baclesse à Caen.

3.2.4. Questionnaire épidémiologique rempli avec les éleveurs le jour des prélèvements

Dans chacun des haras visités, nous avons commencé notre journée en remplissant un questionnaire épidémiologique avec le responsable du haras. L'objectif de ce questionnaire est d'avoir une image plus précise de la structure visitée, en particulier concernant les facteurs de risque principaux décrits pour la rhodococcose du poulain.

La première partie du questionnaire regroupe les informations générales sur la structure, adresse, contact, vétérinaire traitant, date de notre visite. Nous y remplissons aussi la date de création du haras, la ou les race(s) de chevaux élevés, le nombre de cas par an en 2009, 2010 et 2011, ainsi que les critères ayant conduit au diagnostic de ces cas. Nous avons ensuite demandé à l'éleveur s'il utilise des vaccins contre *Rhodococcus equi* sur ses poulinières et/ou sur les poulains.

La deuxième partie du questionnaire concerne les effectifs de chevaux dans le haras (nombre total de chevaux, nombre de poulinières résidentes, nombre de poulinières de passage, nombre de poulains résidents, nombre de poulains de passage, nombre d'étalons et nombre de chevaux de plus d'un an hormis les chevaux pour l'élevage). Dans cette partie, nous nous informons aussi de la STH (Surface Toujours en Herbe) consacrée aux chevaux (zone sur laquelle les chevaux vont pâturer) et la STH consacrée aux juments et à leur poulain. Nous avons relevé le nombre de personnes travaillant sur le haras (en UTH). Enfin nous avons demandé au responsable de situer le taux de remplissage de sa structure au moment de notre visite par rapport à la capacité d'accueil estimée (capacité d'accueil non atteinte, atteinte ou dépassée). Nous avons aussi demandé quel était le critère limitant la capacité d'accueil le cas échéant (place dans les box, dans les herbages, quantité de personnel).

La troisième partie du questionnaire traitait de l'introduction d'animaux extérieurs au haras et le cas échéant de la présence de poulinières extérieures au haras. Nous avons demandé si une période de quarantaine est ménagée lors de l'introduction de nouveaux animaux ; si les animaux n'appartenant pas au cheptel du haras sont mélangés avec les animaux résidents. Enfin, nous avons demandé si le matériel du haras, les paddocks et les herbages sont partagés entre animaux de passage et animaux résidents en particulier :

- la barre de soufflage : moyen de contention de la jument permettant sa présentation à un étalon afin de tester si la jument est en période de chaleur sans risque pour les deux animaux et pour les manipulateurs,
- la barre d'échographie : moyen de contention comprenant une porte fermée derrière la jument permettant de réaliser le suivi et les soins gynécologiques sans risque que la jument ne tape le vétérinaire,
- La barre d'insémination : même type que la barre d'échographie mais dans un local dédié à l'insémination artificielle. Dans de nombreux haras, les mêmes installations servent au suivi gynécologique des juments et aux inséminations artificielles, en revanche dans les haras élevant des chevaux de race Pur-Sang, l'insémination artificielle étant interdite dans cette espèce, il n'y a pas de barre d'insémination.
- Les herbages,
- Les paddocks,
- Les moyens de transport des chevaux.

La quatrième partie du questionnaire regroupe les informations concernant les bâtiments d'élevage, à savoir si les juments suitées sont logées dans des box (logement individuel) ou dans des stabulations (logement collectif), si les logements pour les juments et leur poulain sont séparés des bâtiments logeant les autres types d'équidés, la position de la fumière par rapport au bâtiment des juments et des poulains. Pour les haras disposant d'une salle dédiée aux examens gynécologiques, les enquêteurs jugent de la propreté de la salle le jour de leur visite et de la présence ou non d'une aire en terre devant cette salle.

La cinquième partie du questionnaire épidémiologique comprenait des informations sur la conduite d'élevage : la répartition en pourcentage des naissances sur les périodes janvier-février, mars-avril, mai-juin, juillet-août. Nous demandions enfin au responsable du haras s'il contrôle la concentration du colostrum en IgG à la naissance et s'il réalise un dosage en laboratoire des Immunoglobulines dans le sang des jeunes poulains.

Le questionnaire comprend aussi des informations concernant les surfaces sur lesquelles nous avons réalisé nos mesures que nous détaillerons plus loin.

A la fin de chaque journée de prélèvement, les enquêteurs jugent s'ils trouvent que l'environnement des poulains est poussiéreux ou non.

Au début de l'année 2013, nous avons recontacté par téléphone tous les haras dans lesquels nous nous sommes déplacés, afin de leur demander si entre le jour de notre visite et la fin de l'année 2012, ils avaient observé un cas ou une suspicion de cas de rhodococcose, si oui, nous leur avons demandé quels examens ont permis d'établir le diagnostic, quel a été le traitement mis en place et l'issue de la maladie.

3.3. Protocoles de prélèvements

3.3.1. Prélèvements d'air dans l'environnement des poulains

Notre objectif est de quantifier les bactéries *Rhodococcus equi* présentes dans l'environnement et pouvant être inspirées par les poulains. Pour cela, nous avons recherché un appareil qui puisse être porté par le poulain ou par sa mère dans le champ, le paddock et le box pour chaque élevage. Par ailleurs, nous avons cherché un appareil dont le mode de récolte préserve la viabilité des bactéries afin de permettre leur mise en évidence par culture, de retour au laboratoire. L'échantillon prélevé doit se rapprocher au mieux de celui pouvant être inspiré par le poulain (débit d'air, taille des particules...).

3.3.1.1. Comparaison des différents types de collecteurs d'air.

Différents types de collecteurs de micro-organismes dans l'air existent. Sont retrouvés principalement trois types de fonctionnement :

- La méthode par impaction : l'air est aspiré directement sur une boîte de Pétri, les bactéries se déposent alors par impaction sur la gélose. Cependant ces modèles présentent plusieurs inconvénients :

- L'arrivée frontale des bactéries sur la gélose diminue leur vitalité et empêche la croissance des colonies ;
- L'air est aspiré à travers une grille, les bactéries se retrouvent donc principalement surtout en regard des trous de la grille, il y a donc rapidement un risque d'avoir plusieurs bactéries de souches différentes qui vont croître au même endroit sur la gélose. Par ailleurs, on estime que pas plus de 400 UFC différentes ne vont pouvoir croître sur une boîte de 90 mm de diamètre. Il y a alors rapidement un risque de « saturation » de la gélose : pour une colonie observée sur la boîte de Pétri, on estime qu'il y a 98 % de chances qu'il y ait entre 0 et 3 colonies qui se sont déposées (Loi discrète de Poisson) (GÖRNER *et al.*, 2006). Pour contourner cet obstacle, nous aurions pu envisager de diminuer le temps de prélèvement ; cependant en limitant le temps de prélèvement, la sensibilité de détection diminue pour des germes moins concentrés dans l'air ;
- La méthode par filtration : L'air est aspiré et passe dans une succession de filtres dont les mailles sont de plus en plus serrées qui retiennent chacun une taille de particules ;
- La méthode par « impigment » utilisée dans le CIP 10-M, les bactéries sont immédiatement collectées dans le liquide présent dans la coupelle qui est mis en culture immédiatement au retour au laboratoire. La concentration maximale mesurable avec cette méthode est quasiment illimitée car il est possible de réaliser des dilutions du milieu de collecte (dilutions à 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} systématiquement réalisées pour chaque prélèvement de notre étude). Cependant le passage de l'air le long du liquide entraîne son évaporation progressive, surtout pendant les mois d'été secs et chauds. Lors de la pré-étude de 2011 (PHILIPOT, 2012), nous avons fixé le temps de prélèvement à 1h30, à un débit de 10L/min ; ceci nous est apparu comme le meilleur compromis entre estimation de l'exposition et quantité de liquide restant suffisante. Toutefois, au cours de nos prélèvements, nous noterons systématiquement la quantité de liquide restant dans la coupelle au retour au laboratoire pour nous assurer de la qualité de notre technique de prélèvement.

L'étude menée en 2011 au laboratoire de l'ANSES-Dozulé (PHILIPOT, 2012), a comparé expérimentalement la collecte de *Rhodococcus equi* dans l'air avec trois appareils de prélèvement d'air différents : le CIP 10M, l'Air Idéal® 3P et la pompe DELUXE. Le CIP 10M (Capteur Individuel de Polluants version Microbiologie) a montré en conditions expérimentales les meilleures performances dans l'isolement de *Rhodococcus equi*, une plus grande facilité de mise en œuvre du prélèvement et de traitement des prélèvements au laboratoire. Dans cette même étude, le CIP 10M a ensuite été validé sur le terrain dans un haras sain et un haras atteint. Nous avons utilisé le CIP 10M pour notre étude à plus grande échelle.

3.3.1.2. Appareil utilisé : le CIP 10-M

Le CIP 10 a été développé par la société TECORA (France), initialement destiné à la mesure de l'exposition des salariés aux particules en suspension dans les mines ; le CIP 10 répond aux normes de qualité EN, ISO, ACCGIH. Le CIP 10-M (Microbiologie) est équipé d'une coupelle d'échantillonnage sur liquide pour micro-organismes.

Cet appareil de taille réduite n'est pas bruyant et peut ainsi être fixé au licol d'une poulinière suivie (c.à.d. suivie de son poulain de l'année) pendant la durée du prélèvement. Nous n'avons pas

souhaité prendre le risque de fixer l'appareil sur les poulains, animaux jeunes et craintifs, beaucoup plus sensibles au bruit et aux vibrations de l'appareil. Nous avons choisi de fixer l'appareil au licol d'une jument calme suivie d'un poulain de moins de 6 mois ; la jument utilisée étant choisie par l'éleveur. Le choix d'utiliser la mère comme porteuse de l'appareil afin d'estimer l'exposition de son poulain se justifie car dans les premiers mois de leur vie, les poulains suivent les déplacements de leur mère ; de plus les juments utilisées pour la reproduction sont généralement plus calmes et devraient mieux tolérer la présence de l'appareil.

L'appareil est constitué d'un corps et d'une tête. Le corps contient la batterie, le moteur et la carte électronique réglant la vitesse de rotation du moteur. Dans la tête de l'appareil, se trouve une coupelle rotative contenant le liquide sur lequel les bactéries vont se déposer, enfermée dans un carter ouvert sur le dessus au niveau de la buse. L'ensemble est protégé par un capot empêchant l'entrée de grosses particules ou la contamination par la pluie.

Photographie 2 : CIP 10-M avec la coupelle à gauche; sur la photo de droite, le carter de protection et la buse ont été fixés (GÖRNER *et al.*, 2006).

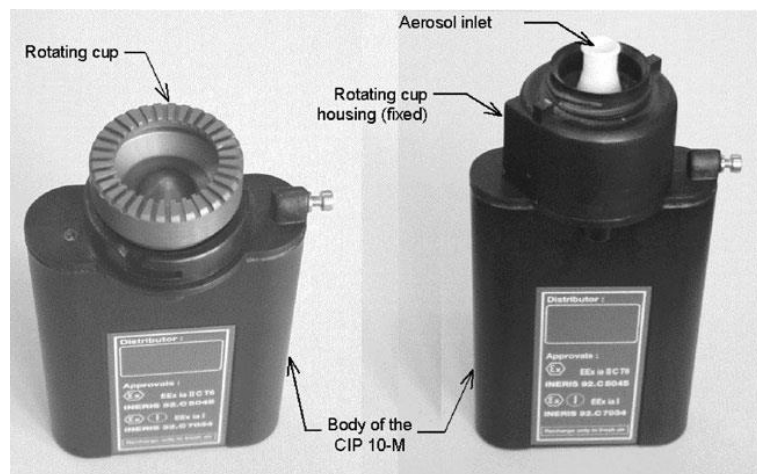


Figure 1 : Schéma des éléments composants la tête du CIP-10M (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par la société Tecora®)

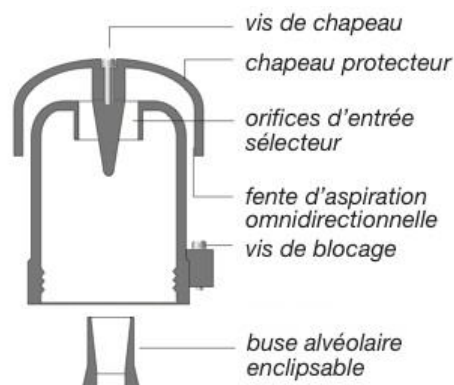
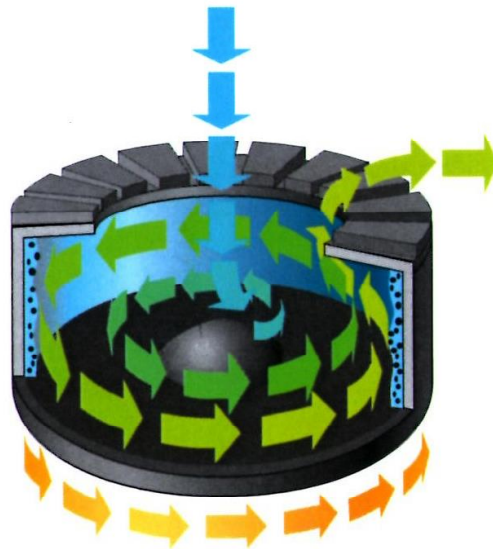


Figure 2 : Schéma présentant le principe de fonctionnement de la coupelle rotative du CIP 10M (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par TECORA®)



La rotation du moteur entraîne la rotation de la coupelle à environ 7000 tours minute, ceci entraîne l'aspiration de l'air au travers de la buse à un débit de 10L/min ; les bactéries présentes dans l'air entrent donc axialement dans la coupelle au travers de la buse. La force centrifuge créée projette le liquide sur les bords de la coupelle, les particules aspirées suivent un trajet hélicoïdal et sont déposées avec un angle faible sur le liquide de collecte ; cette technique a pour avantage de créer une rencontre entre les micro-organismes et le liquide suivant un angle très tangentiel et diminue ainsi le stress causé aux bactéries (GÖRNER *et al.*, 2006).

3.3.1.3. *Efficacité du prélèvement des particules en fonction de leur taille (GÖRNER *et al.*, 2006).*

La mesure de l'efficacité de la collecte de particules dans l'air par le CIP 10-M, a été réalisée dans un tunnel à flux horizontal de faible vitesse. L'appareil utilisé avait un débit d'aspiration de 10 L/min comme dans notre cas et la coupelle avait été remplie de 2,5 mL d'eau distillée stérile.

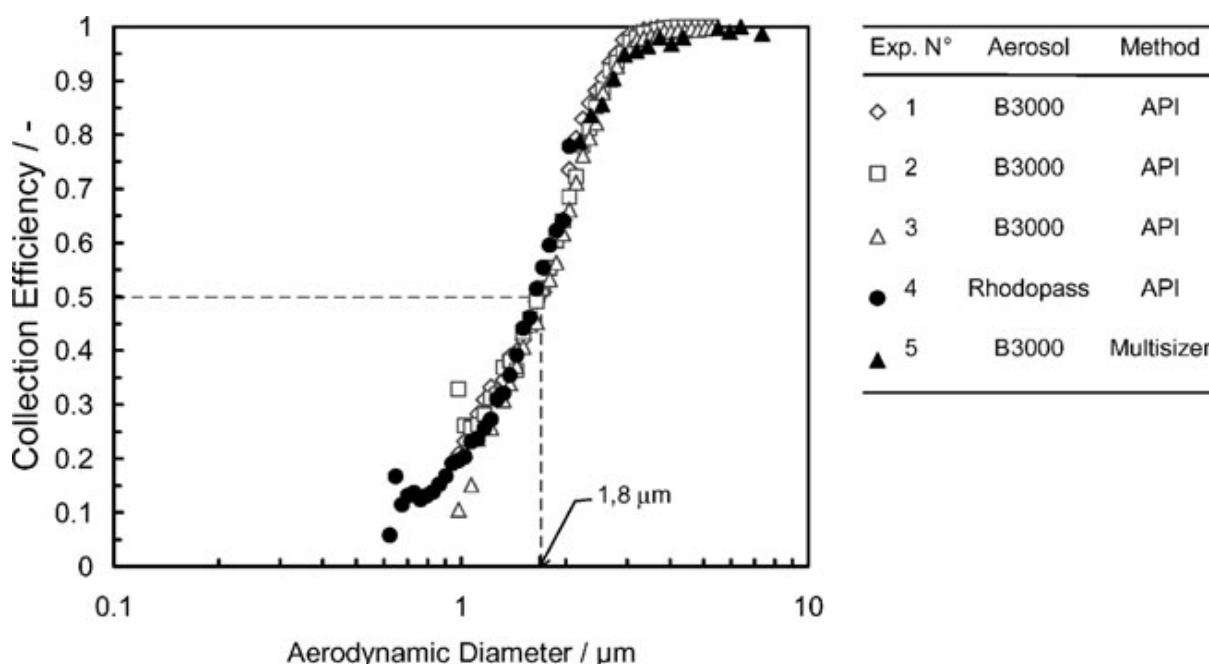
Pour un diamètre de particules donné, l'efficacité de l'aspiration par la coupelle rotative est donnée par le ratio entre la concentration de particules dans l'environnement (C_c) et la concentration de particules entrant dans la coupelle rotative (C_o) :

$$Ee = \frac{C_c}{C_o}.$$

Toujours pour un diamètre de particules donné, l'efficacité de l'échantillonnage est calculée à partir de la concentration de particules rentrant dans la coupelle rotative (C_o) et de la quantité de particules en sortant (C_1) :

$$Ec = 1 - \frac{C_o - C_1}{C_o}.$$

Figure 3 : Evolution de l'efficacité de la collecte des particules par le CIP 10-M, présentes dans l'air en fonction de leur taille (GÖRNER *et al.*, 2006).



Le rendement de la collecte varie en fonction de la taille des particules. Nous pouvons comparer différents appareils à l'aide de la D_{50} : le diamètre de particule pour lequel 50 % des particules présentes dans l'air ambiant sont récoltées par l'appareil. La D_{50} du CIP 10M est de $1,8\mu\text{m}$ de diamètre ; à $2,8\mu\text{m}$ de diamètre, 95 % des particules restent dans le liquide contenu dans la coupelle rotative. *Rhodococcus equi* mesure environ $65\mu\text{m}$ de longueur.

Dans les études sur la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air menées en Australie et en Irlande (MUSCATELLO *et al.*, 2006), les auteurs ont utilisé le M Air T commercialisé par la société Millipore. La D_{50} de cet appareil est de $2,3\mu\text{m}$ (MAINELIS & MAOSHENG, 2004).

Le CIP 10M est donc suffisamment sensible pour récolter *Rhodococcus equi* dans l'air avec une efficacité proche de 100 %. L'appareil a un débit d'aspiration de 10L/min, proche du débit respiratoire des poulains. Cependant notre méthode de quantification de *Rhodococcus equi* (culture bactériologique) demande de conserver des bactéries viables après récolte et jusqu'au retour au laboratoire.

3.3.1.4. Estimation de la proportion de bactéries revivifiables après prélèvement par le CIP 10-M

3.3.1.4.1. Données de la bibliographie sur la survie des bactéries prélevées à l'aide du CIP 10M (GÖRNER *et al.*, 2006).

Dans leur étude publiée en 2006, les auteurs ont divisé en deux le liquide restant dans le CIP 10-M (eau distillée stérile) après une période de 150 minutes de prélèvement. Ils ont mis la première partie du liquide en culture sur des géloses agar + actidione (contre la croissance des champignons) ; la deuxième partie du liquide de collecte a été traitée avec du DAPI-fluorochrome (4',6-diamidino-2-phenylindole) se fixant sur tous les micro-organismes présents (viables ou non), puis dénombrement sur un microscope à épifluorescence (grossissement x1000) à fond noir.

Figure 4 : Concentration de bactéries cultivables. Les concentrations limites détectables C_{LD} des deux types d'appareils utilisés sont rappelées (GÖRNER *et al.*, 2006).

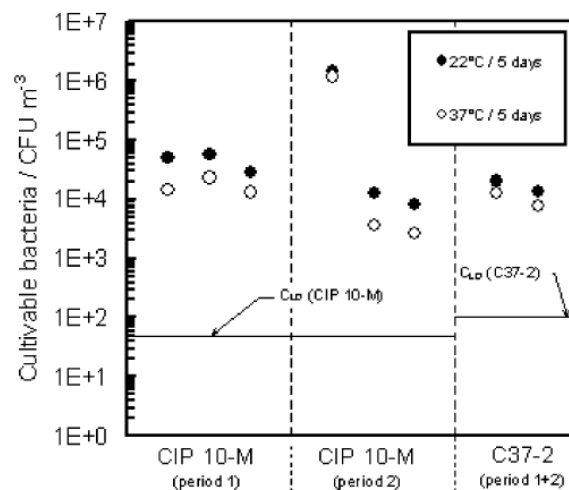
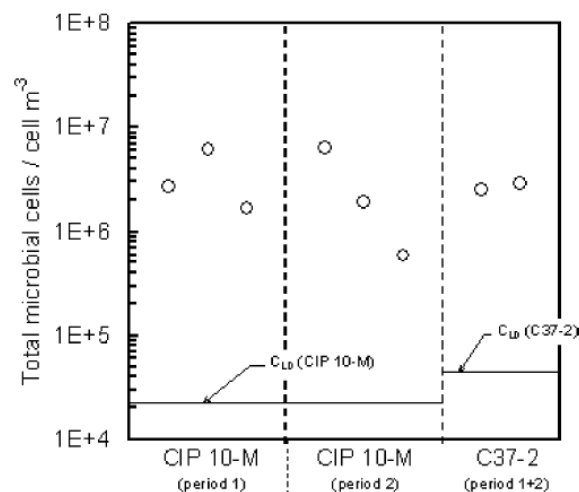


Figure 5 : Concentration en bactéries totales observées par coloration DAPI. Les concentrations limites détectables C_{LD} des deux types d'appareils utilisés sont rappelées (GÖRNER *et al.*, 2006).



Avec l'utilisation d'eau distillée stérile comme milieu de prélèvement, les auteurs ont montré une diminution de deux $\log_{10}$ de la concentration en bactéries revivifiables par rapport aux bactéries totales. Cependant nous n'avons pas dans l'article d'indications sur la conservation du prélèvement avant la mise en culture. Notre protocole prévoit l'utilisation de milieu BHI (Brain Heart Infusion) pour le prélèvement d'air. Devant les résultats de Görner *et al.*, nous avons mis au point un protocole permettant d'estimer l'influence du prélèvement sur la vitalité de *Rhodococcus equi*.

3.3.1.4.2. Protocole de vérification de la survie des bactéries mis au point au laboratoire de l'ANSES-Dozulé

Görner *et al.* ont montré qu'il y a une diminution de la survie des bactéries après la collecte à l'aide du CIP-10M en utilisant de l'eau distillée comme milieu de prélèvement. Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser du BHI comme milieu de prélèvement, ce milieu comprend des nutriments dans de l'eau distillée stérile. Lors de la rotation de l'appareil, le passage de l'air entraîne une évaporation de l'eau contenue dans le milieu, et par conséquent une augmentation de la concentration des nutriments dans le liquide de prélèvement. Ceci peut avoir un effet osmotique néfaste pour la survie de *Rhodococcus equi* lors de la mise en culture, d'autant plus que les prélèvements ne sont mis en culture que lors du retour au laboratoire, quelques heures après la fin du prélèvement.

Nous avons donc élaboré et mis en œuvre un protocole permettant de tester la survie de *Rhodococcus equi* dans les conditions de nos prélèvements, ainsi que pour vérifier la conservation du plasmide de virulence.

Nous utilisons une souche de *Rhodococcus equi* virulent issue de la souchothèque de l'ANSES-Dozulé. Après décongélation d'une cryobille contenant une souche de *Rhodococcus equi* virulent, nous mettons les micro-organismes en croissance sur deux géloses Columbia ANC pendant 24 heures dans une étuve à 37°C. Ensuite nous prélevons deux colonies que nous introduisons dans une solution de 10mL de BHI pour obtenir une suspension bactérienne. Nous réalisons un ensemencement de cette solution mère (concentrations 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), les géloses sont placées 24 heures dans une étuve à +37°C, la solution mère est placée pendant ce temps dans un réfrigérateur à +4°C afin de limiter la croissance bactérienne. Le lendemain, le comptage des colonies sur les géloses permet de connaître la concentration de la solution mère.

Une fois la concentration de la solution mère connue, nous fabriquons une dilution, afin d'obtenir 10 mL de solution fille avec une concentration connue de *Rhodococcus equi* virulent dans 2,5 mL. Nous disposons 2,5 mL de cette solution dans 3 coupelles de CIP stériles.

Lors d'une première manipulation, une coupelle sera fixée sur un CIP qui ne sera pas allumé (témoin), la seconde coupelle sera fixée sur un CIP qui sera allumé pendant 30 minutes, la dernière coupelle sera sur un CIP qui tournera 60 minutes. Dans la deuxième manipulation, une coupelle sera fixée sur un CIP qui restera sans tourner (témoin), la seconde sur un CIP qui tournera pendant 90 minutes, la dernière sur un CIP qui tournera pendant 180 minutes.

A chaque fois, les trois CIP sont disposés dans une étuve à 25°C (température lors de nos journées de prélèvements,) dont la porte reste ouverte pour permettre une bonne circulation d'air.

Une gélose Colombia ANC stérile ainsi qu'une quatrième coupelle contenant 2,5mL de BHI sont disposés sur le plancher de l'étuve afin de contrôler une éventuelle contamination par d'autres germes de l'environnement.

A la mise en route des CIP, nous réalisons une mesure à l'aide du tachymètre afin de connaître la vitesse de rotation de chacun des appareils en suivant la technique utilisée dans notre protocole de prélèvements. Dans chaque manipulation, les appareils sont démarrés au même moment. A la fin de la manipulation le liquide présent dans les coupelles est prélevé après l'arrêt du CIP avec le plus fort temps de rotation. Les liquides des coupelles de CIP sont mis en culture sur des géloses Colombia ANC suivant le protocole appliqué aux prélèvements réalisés sur le terrain (dilutions 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} et triplicatas). L'ensemble des géloses ainsi préparées ainsi que celle présente dans l'étuve sont placées dans une étuve à +37°C pendant 24 heures, le protocole de lecture des géloses d'isolement des souches de *Rhodococcus equi* trouvées sur les géloses et de recherche du plasmide de virulence par PCR est le même que pour les prélèvements réalisés sur le terrain.

Chaque manipulation est répétée trois fois, sur trois jours différents.

3.3.1.5. Protocole de réalisation des prélèvements d'air

La première étape de notre travail a été de vérifier le fonctionnement des CIP au laboratoire avant de partir en prélèvements sur le terrain. Après un échange avec la société fabricant le CIP 10M (TECORA®), nous avons convenu que la mesure la plus pertinente pour vérifier le fonctionnement des CIP était la mesure de la vitesse de rotation des coupelles obtenue à l'aide d'un tachymètre laser.

Au laboratoire, nous avons commencé par vérifier que les 3 moteurs de CIP tournaient à la même vitesse quelle que soit la coupelle fixée dessus. Pour cela, sur chaque appareil nous avons fixé successivement chacune des 6 coupelles de prélèvements dont nous disposions, équipées de deux bandes réfléchissantes diamétralement opposées, après la fixation de chaque coupelle, nous avons allumé l'appareil, nous avons positionné le tachymètre à 20cm du CIP en nous stabilisant à l'aide d'un support, nous déclenchons la mesure et lisons la vitesse de rotation qui s'affiche sur l'appareil. Nous avons observé que les vitesses de rotations mettaient environ 2 à 3 minutes pour se stabiliser et une fois la vitesse de rotation stable, nous avons déclenché trois fois de suite la mesure avec le tachymètre laser : les vitesses obtenues sont ensuite divisées par deux pour obtenir la véritable vitesse de rotation de la coupelle. A la fin des trois mesures, nous avons éteint l'appareil et avons fixé la coupelle suivante.

Afin de suivre le fonctionnement des appareils au cours de la saison de prélèvements, nous avons décidé de mesurer la vitesse de rotation du moteur équipé de la « coupelle test » au début et à la fin de chaque prélèvement d'air. Ayant observé que la coupelle n'influe pas sur la vitesse de rotation du moteur (Annexe 7 : Etude de la variabilité de la vitesse de rotation des CIP en fonction de la coupelle utilisée), nous avons gardé toujours la même « coupelle test » équipée de bandes réfléchissantes, les coupelles utilisées pour les prélèvements étaient stérilisées à l'autoclave et nous ne pouvions pas y laisser les bandes, de plus l'épaisseur des bandes aurait pu gêner la rotation une fois le carter fixé par-dessus la coupelle.

La veille des prélèvements, nous préparons au laboratoire sous le poste de sécurité microbiologique des tubes stériles contenant 2,5mL de BHI (milieu de culture Brain Heart Infusion),

et nous nous assurons que l'ensemble des coupelles, des buses et des carters étaient stérilisés. Les appareils sont mis en charge pendant minimum 3 heures la veille au soir du départ.

Dans le haras, nous préparons les appareils pour le prélèvement d'air de la manière suivante ; afin d'éliminer un éventuel effet du moteur du CIP sur nos résultats, un tirage au sort a été réalisé pour définir quel moteur (1, 2 ou 3) est prévu pour chaque lieu de prélèvement (paddock , box entrée, box fond, champ). Le tirage au sort a été réalisé en ordonnant à l'aide de la fonction Aléa sur Windows Excel® les numéros des moteurs, le premier moteur désigné était affecté au prélèvement dans le paddock, le second et le troisième étaient respectivement positionnés à l'entrée et au fond du box ; un nouveau tirage au sort parmi les trois moteurs désignait l'appareil utilisé dans le champ. Nous prenions ensuite au hasard une coupelle stérile, une buse et un carter.

Le moteur est posé sur une surface plane et dégagée afin d'éviter sa chute et les contaminations. Nous commençons par tester la vitesse de rotation du moteur, à l'aide de la « coupelle test ». Nous attendons deux minutes le temps que la vitesse de rotation soit stabilisée, puis nous mesurons la vitesse de rotation à l'aide d'un tachymètre laser⁶. La mesure est notée, l'appareil est arrêté. Nous remplaçons ensuite la « coupelle test » par une coupelle stérile dans laquelle nous vidons un tube de 2,5mL de BHI stérile. Le carter est positionné ainsi que la buse. L'appareil est remis en marche immédiatement cela permet de vérifier qu'il n'émet pas de bruits anormaux avant de l'approcher de la jument, la force centrifuge créée par la rotation permet d'éviter que le liquide sorte de la coupelle.

Nous avons observé en testant chaque coupelle sur chacun des trois moteurs que lorsque la coupelle n'est pas correctement emboîtée sur le moteur, le dispositif vibre et fait du bruit à la mise en route. C'est pourquoi, une fois l'appareil monté, nous avons vérifié l'absence de vibrations et de bruit au démarrage du moteur, avant la fixation sur le licol de la jument.

Pour les prélèvements dans le champ et le paddock, l'appareil est ensuite inséré dans une housse de protection (le Rhodopop[®]), puis fixé au licol de la jument choisie à l'aide de deux lanières en cuir. La jument est ensuite lâchée dans le champ ou paddock après que nous ayons vérifié avec le responsable du haras qu'elle n'est pas perturbée par l'appareil et qu'elle peut baisser la tête pour manger. La jument reste pendant 90 minutes avec l'appareil en marche, un opérateur du laboratoire reste à proximité pendant toute la durée du prélèvement pour s'assurer de la tolérance de la jument pour l'appareil et l'empêcher de plonger l'appareil dans l'abreuvoir.

⁶ Lors du déclenchement de la mesure, l'appareil envoie un faisceau laser qui est réfléchi par les deux bandes présentes sur la coupelle à chaque fois qu'elles passent dans le faisceau. La mesure obtenue correspond donc à deux fois la vitesse de rotation. Nous avons utilisé deux bandes réfléchissantes diamétralement opposées afin d'équilibrer le poids de la coupelle en rotation.

Photographie n° 2 : Le Rhodopopus® après sa confection. Une boucle de plastique permet d'ajuster les lanières au plus près du CIP.



Photographies 3 et 4 : Le « Rhodopopus » permet la fixation du CIP10M au licol d'une jument suitée, sans perturber l'aspiration de l'air (Courtoisie Damien Philipot).



Pour les prélèvements dans le box, nous avons décidé de ne pas fixer les appareils à la tête de la jument. En effet, l'observation du comportement d'une jument et de son poulain au box, montre que la jument passe beaucoup de temps debout, voir la tête sortie du box. En revanche son poulain est très souvent couché sur le sol du box. L'exposition aux aérosols du poulain ne peut donc pas être estimée par celle de sa mère dans un box. Cette observation est renforcée par le fait qu'aucune bactérie *Rhodococcus equi* n'avait été retrouvée dans l'air du box dans l'étude menée l'année précédente (PHILIPOT, 2012), avec l'appareil fixé sur le licol de la poulinière. Nous avons donc

positionné l'appareil dans une boîte de protection posée au sol. La boîte de protection a été construite en bois, puis peinte pour en faciliter le nettoyage; cette protection permet d'éviter un choc sur l'appareil posé à même la litière, le bois évite que les animaux dans le box puissent se blesser et la boîte est largement ouverte en région de la zone d'aspiration de l'air pour ne pas perturber l'échantillonnage. Les appareils étant immobiles dans le box, contrairement au champ et au paddock, afin de maximiser nos chances de retrouver *Rhodococcus equi* dans l'air, nous avons choisi d'utiliser deux CIP 10M : les appareils chacun dans leur boîte sont placés l'un proche de l'entrée du box, l'autre au fond du box diamétralement opposé au premier. Le prélèvement d'air dure 90 minutes, un opérateur du laboratoire reste à la porte du box pour s'assurer du bon déroulement du prélèvement.

A la fin de la période d'échantillonnage, l'appareil est récupéré, ramené à la voiture et arrêté. L'opérateur met une paire de gants à usage unique en latex, démonte le carter. A l'aide d'une pipette, l'opérateur récupère l'ensemble du liquide restant dans la coupelle et le met dans un tube stérile dûment identifié, puis placé dans un bac réfrigéré. Après avoir enlevé la coupelle qui a servi au prélèvement, il remet la coupelle test sur le moteur, démarre celui-ci et mesure la vitesse de rotation de l'appareil en fin de prélèvement. Le boîtier du moteur est ensuite nettoyé à l'aide d'une lingette désinfectante et rangé pour la prochaine utilisation.

Nous avons choisi d'utiliser comme milieu de prélèvement du milieu BHI liquide dans les coupelles. La norme AFNOR recommande d'utiliser un milieu non nutritif. Cependant au vu du temps entre la fin du prélèvement dans le haras et la mise en culture au laboratoire, les expériences précédemment menées au laboratoire montrent que *Rhodococcus equi* ne peut pas être isolé si on utilise de l'eau distillée. Nous avons donc choisi ce milieu nutritif en plaçant les prélèvements dans une glacière avec des pains de glace pour inhiber la croissance bactérienne jusqu'au retour au laboratoire.

3.3.2. Protocoles de réalisation des prélèvements de terre

3.3.2.1. Prélèvements de terre à l'extérieur

Rhodococcus equi est hébergé dans le sol suite à son excrétion dans les fèces des animaux atteints, mais aussi des poulinières et des poulains sains. Par temps sec et chaud, le sol émet des poussières contenant *Rhodococcus equi* qui sont supposées être la source de la contamination des poulains. Nous avons ainsi complété les mesures de concentration dans l'air avec une recherche de la concentration de la bactérie dans le sol, afin de déterminer s'il existait une corrélation entre les concentrations dans le sol et dans l'air ; afin d'étudier des facteurs environnementaux pouvant influencer la corrélation entre les concentrations de la bactérie dans l'air et dans le sol, nous avons aussi réalisé des mesures d'humidité du sol.

3.3.2.1.1. Prélèvements bactériologiques

Dans l'étude menée en 2011 (PHILIPOT, 2012), des prélèvements de terre ont été réalisés à plusieurs profondeurs (surface, 5 cm, 20 cm et 50 cm) dans un champ et un paddock d'un haras atteint et un haras sain. Cette étude a montré que les concentrations en *Rhodococcus equi* total et virulent à la surface et à 5 cm de profondeur sont les plus corrélées au statut du haras. Nous

avons donc conservé le protocole de prélèvement de terre à la surface et à 5 cm de profondeur dans le champ et le paddock en prélevant à chaque fois à l'entrée, en face de l'abreuvoir et au centre de la surface concernée.

A chaque place, un opérateur commence par mettre une nouvelle paire de gants en latex, puis il gratte la surface de la terre pour récolter une dizaine de grammes de terre. Cet échantillon est inséré dans un tube Eppendorf® à usage unique, étanche et identifié (numéro du haras, lieu de prélèvement, profondeur 0cm). Un second opérateur creuse ensuite la terre jusqu'à 6 cm de profondeur à l'aide d'une tarière à main et retire délicatement l'appareil du sol en prenant garde à remonter la carotte de terre avec la tarière, puis il retire les 4 cm de terre en haut de la carotte. L'autre opérateur muni de gants prélève la terre restant dans la tarière et la met dans un nouveau tube Eppendorf® dûment identifié. A l'aide d'un réservoir d'eau, les opérateurs nettoient la tarière avant de se déplacer au lieu de prélèvement suivant ; nous n'utilisons pas de substance bactéricide à cette étape afin d'éviter une rémanence du produit qui nuirait à la viabilité des bactéries pour le prélèvement suivant.

3.3.2.1.2. Prélèvements Humidité et pH

Rhodococcus equi virulent est statistiquement plus présent dans l'air quand la terre est à moins de 10 % d'humidité ($p=0,02$). De même la bactérie virulente est plus présente quand le pH de la terre est inférieur à 6 (favorise l'expression des gènes de virulence) (MUSCATELLO *et al.*, 2006). Nous avons donc complété nos prélèvements de terre avec des échantillons destinés à la mesure de l'humidité et du pH.

Ces échantillons étaient prélevés à quelques centimètres du prélèvement bactériologique « centre » du paddock et du champ. A l'aide de la tarière, un opérateur creusait le sol sur une dizaine de centimètres, l'ensemble de la carotte prélevée est placée dans un pot d'une contenance de 30 cL environ. Nous prélevons autant de terre que nécessaire pour remplir le pot en totalité afin d'éviter une évaporation de l'eau contenue dans la terre une fois le pot fermé.

3.3.2.2. *Prélèvements de surface dans le box*

Par analogie avec les prélèvements de terre dans le champ et le paddock, nous avons réalisé des prélèvements sur le sol du box. A la fin du prélèvement d'air, après avoir récupéré les deux appareils de collecte, un opérateur mettait une paire de gants à usage unique et déplaçait une lingette stérile imbibée d'eau peptonée fournie par le laboratoire Grosseron. A l'aide du pied nous écartions la litière au centre du box afin de dégager un carré du sol du box correspondant à la taille de la lingette. La lingette était appliquée sur le sol d'un côté puis de l'autre avant d'être roulée délicatement et insérée dans un tube Eppendorf refermé, puis dûment identifié.

3.3.3. Déroulement des prélèvements dans les haras

Afin de ne pas imposer des horaires trop contraignants pour les éleveurs, ainsi que pour des raisons de sécurité et de disponibilité du matériel, nous avons choisi de ne nous déplacer que dans un seul élevage par journée de prélèvement. A l'arrivée dans le haras, les enquêteurs savaient si la structure visitée appartenait aux élevages sains ou atteints. Nous avons choisi de ne pas réaliser d'enquête en aveugle pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'objectif de notre étude est de mesurer

la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air, ce paramètre est totalement objectif, la méthode de prélèvement étant standardisée. Ensuite, afin de confirmer la présence de cas dans les années précédentes, une des premières questions posées aux éleveurs concernait l'historique des cas en 2009, 2010 et 2011, les enquêteurs auraient donc eu les informations sur le statut de l'élevage avant de commencer les prélèvements. Enfin pour des raisons de communication avec les éleveurs, vu l'impact que la maladie peut avoir sur leurs poulains, nous préférons connaître le statut de leur haras pendant que nous leur parlions.

Après avoir rempli le questionnaire avec l'éleveur nous fixons le premier appareil de prélèvement d'air sur le licol d'une jument qui sera ensuite mise en liberté dans le paddock. Pendant la fixation, nous réexpliquons l'ensemble des mesures de sécurité prises pour assurer le bon déroulement de la récolte ; nous choisissons en accord avec l'éleveur le paddock présentant les conditions optimales pour retrouver *Rhodococcus equi* dans l'environnement et notamment en aérosols (présence de cas, grande quantité de poussières, paddock utilisé fréquemment pour un grand nombre de couples jument-poulain différents). Pendant l'heure et demi de prélèvement d'air dans le paddock, nous lançons les prélèvements d'air et de sol dans un box dans lequel se trouvent un jeune poulain et sa mère, puis nous réalisons les prélèvements de terre dans le paddock. Une fois le prélèvement d'air terminé dans le paddock et dans le box, nous récupérons les appareils, puis récoltons le liquide dans les coupelles et nous nettoyons les appareils. Ensuite nous utilisons une nouvelle coupelle stérile et nous préparons l'appareil pour le prélèvement d'air dans le champ. Nous équipons (en présence du responsable qui est revenu pour attraper la jument dans le paddock) la jument qui sera en liberté dans le champ pour une heure et demie de prélèvement d'air. Pendant le prélèvement, nous réalisons les prélèvements de terre dans le champ. A la fin de cette période nous récupérons la jument (en présence du responsable), nous enlevons l'appareil et nous récoltons le liquide de prélèvement. Nous quittons l'élevage après avoir nettoyé notre matériel, ainsi que nos chaussures et salué le responsable en le remerciant pour son accueil.

3.4. Traitement des prélèvements au laboratoire

3.4.1. Traçabilité des prélèvements

Les objectifs de notre système de numérotation des prélèvements sont de distinguer pour chaque prélèvement l'élevage dont il provient et la surface sur laquelle il a été récolté.

Les élevages ont été numérotés dans l'ordre dans lequel nous les avons visités, nombre précédé de la lettre « H » (pour Haras). Le système de numérotation permet l'anonymat des résultats publiés et permet qu'une fois arrivés au laboratoire de bactériologie, les opérateurs n'aient pas le statut du haras accessible pendant qu'ils dénombrent les colonies de *Rhodococcus equi*. Les deux premiers élevages visités étaient ceux ayant participé à l'étude menée l'année précédente pour la mise au point de la technique de prélèvement dans l'air (PHILIPOT, 2012), ils ont été numérotés T0 (le haras sain) et R0 (le haras atteint).

Pendant le chemin de retour de l'élevage, l'ensemble des prélèvements est placé dans une enceinte isolée munie d'un pain de glace afin d'assurer leur refroidissement et de limiter la multiplication des bactéries entre la fin du prélèvement et la mise en culture.

Les liquides récupérés lors des prélèvements d'air sont dilués etensemencés le jour même dès le retour au laboratoire. En fonction du temps disponible, les prélèvements de terre sont traités le soir même ou dans les 54 heures suivants le retour au laboratoire et conservés à +4°C dans l'attente de leur traitement.

Les numéros de lot de l'ensemble du matériel utilisé sont conservés dans les archives du laboratoire.

Au retour au laboratoire, les boites de culture sont identifiées avec les informations suivantes :

- Numéro du haras : R0, T0, H1-H10,
- Surface d'où est issu le prélèvement (P=paddock, C=Champ, Be=Box entrée, Bf=Box fond),
- Pour les prélèvements de terre uniquement,
 - o Lieu du prélèvement (Entrée, Abreuvoir, Centre),
 - o Profondeur du prélèvement (0 cm ou 5 cm),
- Pour les prélèvements d'air uniquement,
 - o Dilution,
 - o Numéro de triplicata,
- Après lecture numérotation des souches : (pour PCR et souchothèque),
 - o Identification du haras,
 - o Numéro de souche (un tableau de concordance permet de faire le lien entre le numéro de souche et le prélèvement d'origine).

3.4.2. Mise en culture bactériologique

3.4.2.1. Prélèvements d'air

Pour chaque coupelle, nous récupérons la totalité du volume de BHI restant dès la fin du prélèvement, dans les haras. Le milieu est transvasé dans des tubes stériles à l'aide d'une pipette munie de cônes stériles à usage unique incluant un filtre afin d'empêcher la contamination du liquide par l'extrémité de la pipette.

A l'arrivée au laboratoire, sous un PSM (Poste de Sécurité Microbiologique), nous notons pour chaque prélèvement le volume de liquide présent dans le tube.

3 fois 100µL de ce liquide sont immédiatement disposés à l'aide d'une pipette Eppendorf® sur trois géloses Columbia ANC (triplicata). Nous prélevons ensuite 100µL que nous plaçons dans un nouveau tube, dans lequel nous rajoutons 900µL de BHI (dilution au 10^{-1}) ; nous prélevons à nouveau 100µL de la dilution obtenue que nous diluons dans 900µL de BHI (dilution au 10^{-2}). Pour chacune de ces dilutions, nous disposons 3 fois 100µL sur des géloses Columbia ANC (triplicata). La Columbia ANC est une gélose au sang (milieu de croissance) auquel sont ajoutés deux antibiotiques actifs contre les bactéries GRAM-, l'acide nalidixique (Quinolone) et la colistine (Polymyxine).

Nous déplaçons ensuite l'ensemble des géloses dans un cône de stérilité obtenu à l'aide d'un bec benzène. A l'aide de pipettes râeaux stériles à usage unique nous étalons le liquide présent sur chaque gélose.

Le reste de liquide récupéré dans la coupelle est centrifugé à 2000 G pendant 5 minutes. Nous retirons le surnageant, prélevons le culot à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée et nous ensemençons une gélose Columbia ANC.

Toutes les géloses ensemencées sont mises à incuber dans une étuve à +37°C pendant 24 heures.

3.4.2.2. Prélèvements de terre à l'extérieur

Les prélèvements de terre réalisés dans les haras sont stockés à +4°C dans une glacière jusqu'au retour au laboratoire. Pour les prélèvements qui seront utilisés pour la recherche de *Rhodococcus equi*, la basse température permet de limiter la croissance bactérienne dans le prélèvement avant la mise en culture.

Pour chaque prélèvement, nous prélevons 1 gramme de la terre contenue dans le tube, que nous transférons dans un nouveau tube Falcon, celui-ci est ensuite rempli d'eau distillée stérile *qsp* 40mL, en homogénéisant régulièrement. Le tube est ensuite dûment identifié.

L'ensemble des tubes est placé dans des supports, les maintenant verticalement dans une étuve à +37°C avec une agitation continue pendant 30 minutes. A la fin de cette période, pour chaque tube, nous prélevons 3 fois 100µL à l'aide d'une pipette Eppendorf®, que nous plaçons sur 3 géloses Columbia ANC. Une fois tous les tubes prélevés, nous déplaçons les géloses dans un cône de stérilité obtenu à l'aide d'un bec benzène, auprès duquel nous nous plaçons pour étaler le liquide contenu sur chaque gélose à l'aide de pipettes râpeaux stériles à usage unique.

Dans la dilution ainsi réalisée, 1 UFC observée sur une gélose correspond à 4×10^2 germes par gramme de terre.

3.4.2.3. Prélèvements de surface dans les box

Les lingettes d'eau peptonnée sont retirées du tube dans lequel elles ont été placées après le prélèvement dans le box, puis placées dans un tube Falcon® de 50mL, nous ajoutons de l'eau distillée pour obtenir 40mL dans le tube.

Les tubes sont alors placés dans des supports les maintenant verticalement dans une étuve à +37°C avec une agitation continue pendant 30 minutes. A la fin de cette période, pour chaque tube, nous prélevons 3 fois 100µL à l'aide d'une pipette Eppendorf®, que nous plaçons sur 3 géloses Columbia ANC. Une fois tous les tubes prélevés, nous déplaçons les géloses dans un cône de stérilité obtenu à l'aide d'un bec benzène, auprès duquel nous nous plaçons pour étaler le liquide contenu sur chaque gélose à l'aide de pipettes râpeaux stériles à usage unique.

3.4.3. Lecture des géloses

La première lecture est réalisée 48 heures après l'ensemencement des géloses. Si aucune colonie de *Rhodococcus equi* n'est observée, la boîte est replacée à l'étuve (+37°C) pendant 24 heures ; s'il n'y a toujours pas de colonies, les géloses sont placées sur la paillasse du laboratoire à température ambiante pendant au moins une semaine, elles sont vérifiées tous les jours. Lorsque des colonies correspondant à l'aspect de *Rhodococcus equi* sont observées (colonies rosées en forme de

tâche de bougie), chaque colonie est prélevée et réensemencée sur une nouvelle gélose ANC afin d'obtenir une souche pure qui sera ensuite utilisée pour la recherche du plasmide de virulence par PCR.

L'observation fréquente des géloses permet de compter précisément le nombre de bactéries. En effet lors de leur croissance, les colonies peuvent se chevaucher voir se masquer rendant leur dénombrement incomplet, la norme AFNOR NF EN 13098 :2000-12 recommande de dénombrer les colonies présentes sur une gélose, quand la surface totale des colonies représente moins de 50% de la surface de la gélose.

NB : Streptococcus equi equi est le germe de la gourme chez le cheval, maladie très contagieuse et avec une forte morbidité, les colonies étant facilement identifiables à leur aspect sur la gélose. Si nous trouvons une colonie de ce type dans l'air, nous l'isolons et nous en informons l'éleveur.

3.4.4. Calcul du nombre d'UFC de *Rhodococcus equi* par unité de volume d'air.

Nous utilisons la formule extraite de la norme NF EN 13098 :2000-12 permettant le calcul des UFC à partir des suspensions liquides obtenues par des échantillonneurs à « impingement » ou des échantillonneurs à filtre.

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

C	est la concentration, en UFC/m ³ d'air
d	est le facteur de dilution à partir duquel la première dilution dénombrable a été obtenue
n1	est le nombre de plaques identiques dans la première dilution dénombrables
n2	est le nombre de plaques identiques dans la deuxième dilution dénombrables
V0	est le volume total de suspension liquide, en mL
V1	est le volume de l'inoculum appliqué à chaque plaque de gélose, en mL
Va	est le volume total d'air prélevé, calculé à partir du taux d'échantillonnage et du temps d'échantillonnage, en mètres cubes
ΣC	est la somme de colonies sur toutes les plaques dénombrées, en nombre d'unité formant colonie

La norme AFNOR 7218 sur la microbiologie des aliments attire notre attention sur l'interprétation de la répartition des colonies comptées en fonction de la dilution. Il est normal d'observer plus de colonies sur les géloses ensemencées sans dilution que sur les géloses ensemencées avec le liquide de prélèvement dilué à 10⁻². En revanche, il arrive que nous ne retrouvons pas de *Rhodococcus equi* sur les géloses non diluées alors que l'on retrouve une ou plusieurs colonies de *Rhodococcus equi* sur les géloses diluées à 10⁻². Ainsi pour le même ΣC obtenu différemment, la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air calculée est la même, mais dans le second cas le résultat sera à interpréter avec plus de prudence.

3.4.5. Recherche du plasmide de virulence par PCR

Toutes les colonies de *Rhodococcus equi* présentes sur chaque boîte de culture sont récupérées, placées dans des tubes Eppendorf 1,5mL, avec des cryobilles et un cryoprotecteur, puis sont stockées à -80°C. Lorsqu'un nombre suffisant de souches de *Rhodococcus equi* sont isolées, les tubes sont décongelés pour l'analyse PCR.

Le protocole utilisé a été mis au point par Monsieur Fabien Duquesne (ANSES-Dozulé), il est inspiré d'une méthode publiée en 2005 par Takai *et al.*. A l'aide de cette technique, nous pouvons identifier de façon spécifique la protéine VapA qui est codée par le gène vapA présent chez et uniquement chez les bactéries pathogènes.

Préparation de l'ADN : Pour cette technique de PCR, nous pouvons préparer directement l'ADN 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 ensuite être conservé à -80°C en attendant son utilisation. Les tubes Eppendorf contenant les souches isolées sont sortis du congélateur (-80°C), chauffés pendant 10 minutes à +100°C puis centrifugés 1 minute à 5 000 g. Le surnageant comprenant l'ADN, l'ARN, les glucides et les ions est récupéré et placé dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5mL.

Préparation du prémix : Dans des tubes Eppendorf de 25µL ; nous mettons 12,5µL de prémix commercial « Master Mix ReddyMixAbgene 2x » comprenant tous les ingrédients nécessaires à la réalisation de la Polymerase Chain Reaction hormis l'ADN (tampon tris-HCL, les acides nucléiques, la TAQ Polymerase, du MgCl₂, du (NH₄)₂SO₄ et un colorant Tween 2018). Le prémix est manipulé sous un PSM de classe II et maintenu en contact avec de la glace, nous ajoutons 8,5µL d'eau ultra pure stérile et les amorces Rho1 (1µL soit 10µmol) et Rho2 (1µL soit 10µmol) toujours sous le PSM. En dehors du PSM, nous ajoutons ensuite 2µL du surnageant contenant l'ADN.

Amplification : Dans une salle spécifiquement dédiée aux manipulations avec du BET (agent intercalant), nous positionnons les tubes Eppendorf de 25µL précédemment préparés dans le thermocycleur et réalisons une dénaturation initiale à +94°C pendant 5 minutes, viennent ensuite 35 cycles :

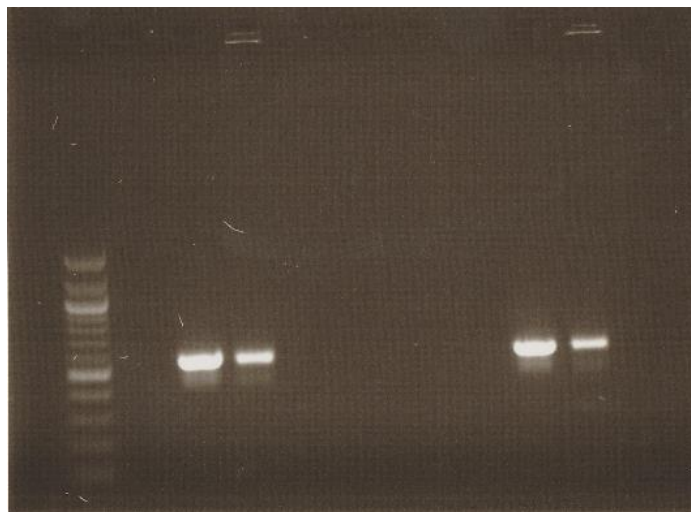
- Dénaturation à 94°C pendant 3 secondes,
- Hybridation à +56°C pendant 45 secondes,
- Elongation à +72°C pendant une minute.

Le produit est ensuite conservé à une température de +4°C jusqu'à son retrait de la machine.

Migration sur gel d'agarose : Nous préparons 200mL de gel à 1% d'agarose permettant la séparation du fragment que nous cherchons à mettre en évidence (563 paires de bases) ; nous ajoutons 4 gouttes de BET. Avant que le gel ne polymérise, à l'aide de 2 ou 3 peignes, nous créons dans le gel 64 ou 96 puits en fonction du nombre d'échantillons à tester. Chaque peigne crée 32 puits dont un servira pour faire migrer le marqueur de taille, le second sera un témoin négatif et le troisième sera un témoin positif ; nos échantillons sont disposés sur les 29 puits restants. Une fois le gel polymérisé, nous retirons précautionneusement les peignes et disposons le gel sur son support dans une cuve immergée de TBE 1x. Nous remplissons ensuite les puits avec 10µl (marqueur de taille 100pb, témoin +, témoin -, échantillons). La migration se fait pendant 60 minutes en réglant le générateur à 85V/1h.

Révélation : Une photographie du gel est prise dans le « Gbox », puis imprimée pour interprétation.

Photographie 5 : Résultats de la PCR après révélation par la « Gbox » (Courtoisie Corinne Sevin, ANSES-Dozulé).



3.4.6. Mesure de l'humidité et du pH

Pour les prélèvements à partir desquels nous allons déterminer l'humidité et le pH du sol, nous cherchons à limiter l'évaporation de l'eau contenue dans le prélèvement en remplissant au maximum les tubes, puis en les mettant au froid pour les acheminer au laboratoire. Les prélèvements de terre sont traités dans les 54 heures suivant le retour au laboratoire au maximum.

3.4.6.1. Détermination du taux d'humidité de la terre

A partir du prélèvement réalisé au milieu de la surface, dans lequel tous les brins d'herbe et les cailloux ont été retirés, nous prélevons un échantillon de 10 à 30 g que nous plaçons dans une balance à humidité modèle PMB 202. Cette balance pèse l'échantillon inséré, puis à l'aide d'un système infra-rouge chauffe l'échantillon entraînant l'évaporation de l'eau qu'il contient jusqu'à stabilisation du poids. Le rapport entre la perte de poids et le poids de l'échantillon au départ permet à la balance de calculer automatiquement le pourcentage d'humidité.

3.4.6.2. Détermination du pH de la terre

A partir du prélèvement réalisé au milieu de la surface, après avoir retiré l'ensemble des brins d'herbe présents, nous avons fait sécher 40 g de terre à température ambiante, inférieure à +40°C. Lorsque la terre est suffisamment sèche, nous l'avons tamisée, puis nous avons inséré 10 g de terre tamisée dans un tube à usage unique contenant 25mL d'eau, dont le pH est supérieur à 5,6. Nous avons agité le tube pendant une heure à une température de +20°C +/- 2°C, laissé ensuite reposer pendant 30 minutes avant de mesurer le pH. Enfin, nous avons mesuré le pH de l'échantillon à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné.

3.5. Méthodes utilisées pour l'analyse statistique

La base de données Excel® comporte 12 lignes et 142 variables (cf ANNEXES 9 à 16 : Présentation des résultats).

Les données sont représentées à l'aide d'un ensemble de paramètres et de graphiques simples (nuages de points, box plot, diagrammes en bâtons). Par ailleurs des tests statistiques non paramétriques ont été effectués (test de Fisher et de Mann-Whitney). Le seuil de significativité choisi est de 0,05 pour tous les tests statistiques de l'étude. Ces tests permettront de mettre en évidence une différence significative ou non entre les élevages témoins et les élevages atteints.

Le test de Fisher a été effectué pour tester l'indépendance entre les variables qualitatives. Ce test s'utilise lorsque les effectifs sont faibles. L'hypothèse nulle que l'on veut tester est : « les variables ne sont pas indépendantes »

Le test de Mann-Whitney a été réalisé pour les variables quantitatives entre les lots non appariés. Le U de Mann-Whitney (comparaison des médianes) teste l'hypothèse que les distributions sous-jacentes aux deux groupes sont les mêmes (hypothèse nulle).

Le test de Wilcoxon a été réalisé pour les variables quantitatives entre les lots appariés. Le U de Wilcoxon (comparaison des médianes) teste l'hypothèse que les distributions sous-jacentes aux deux groupes sont les mêmes (hypothèse nulle).

L'analyse des résultats a été effectuée à partir de plusieurs logiciels statistiques : Epi Info®, Excel® et complément StatEL pour Excel®.

4. Résultats

4.1. Description de l'échantillon

4.1.1. Déroulement et résultat du recrutement des haras

Au début de l'enquête, nous avons constitué à partir des données fournies par le SIRE la liste des élevages déclarant plus de 15 naissances de poulains par an en 2011. Puis nous avons croisé ces données avec celles de la base de données des autopsies réalisées dans l'unité épidémiologie et anatomie pathologique de l'ANSES de Dozulé pour classer les élevages ayant déjà envoyé un poulain dont l'autopsie et l'examen bactériologique complémentaire ont conclu à une forme pulmonaire de rhodococcose entre 2005 et 2012. Nous avons ainsi une liste d'élevages « sains » et d'élevages « atteints ». Nous avons ordonné de manière aléatoire les élevages dans deux listes. Ensuite, nous avons vérifié ces données auprès du vétérinaire traitant de chaque haras afin d'éliminer les élevages que nous considérions sains mais dans lesquels il y a eu des suspicions de rhodococcose et vérifier que les haras que nous classions atteints l'étaient toujours. Enfin nous avons contacté les éleveurs dans l'ordre aléatoire défini précédemment ; les élevages « sains » et les élevages « atteints » ont été appelés par deux personnes différentes.

Sur les 113 élevages ayant plus de 15 naissances par an en 2011, et pour lequel aucune autopsie concluant à une forme de rhodococcose n'avait été réalisée à l'ANSES, nous avons recherché le vétérinaire traitant des 42 premiers. Sur ces 42 élevages supposés « sains », nous avons pu trouver le nom du vétérinaire traitant dans les archives du laboratoire pour 33 élevages. Sur ces élevages, l'appel au vétérinaire a conduit à l'élimination de 9 haras, pour lesquels le vétérinaire a déjà fortement suspecté ou diagnostiqué une forme de rhodococcose. Un haras a été éliminé car il élevait uniquement des poneys de race Shetland. Sur les 24 élevages « sains » restants, trois haras étaient injoignables par téléphone, deux éleveurs ont refusé que nous venions et deux nous ont indiqué des cas qui n'avaient pas été rapportés par le vétérinaire traitant (pour le premier, un cas datant de l'année précédente ; pour le second, un cas survenu quelques jours après que nous ayons contacté l'éleveur). Un autre élevage nous a annoncé rencontrer de nombreux cas depuis quelques années et nous a fait part de sa grande motivation et de sa disponibilité pour nous recevoir ; après un examen approfondi des examens complémentaires réalisés, nous avons convenu que cet élevage comprenait les preuves suffisantes pour être considéré atteint, nous lui avons alors proposé de le recontacter à la fin de notre période de prélèvement si nous avions encore du temps pour nous y rendre, c'est le dernier élevage que nous avons visité (H10) (voir figure 6).

Parmi les 30 élevages ayant plus de quinze naissances par an et ayant envoyé un poulain mort de rhodococcose pulmonaire en autopsie à l'ANSES-Dozulé, nous avons trouvé une correspondance avec un vétérinaire référent pour 29, et tous nous ont été confirmés comme ayant des cas par les vétérinaires que nous avons contacté. Un vétérinaire a demandé à ce que nous ne contactions pas les deux élevages de sa clientèle présents sur notre liste. Un Haras a changé de propriétaire l'année précédente, nous ne l'avons pas contacté car les méthodes d'élevages ont pu changer entre l'époque où les cas de rhodococcose pulmonaire se sont déclarés et le moment où nous serions allés réaliser nos prélèvements. Un élevage a refusé de nous recevoir après notre entretien téléphonique. Pour 3

élevages, la discussion avec le vétérinaire traitant ou l'éleveur nous a révélé qu'il n'y avait eu que très peu de poulains atteints et aucun cas dans les trois dernières années, ces élevages ont été placés en fin de liste afin de ne nous y déplacer que si nous avons encore le temps. Parmi les élevages atteints restants, nous avons pu visiter six haras atteints (les autres haras étaient soit injoignables, soit nous n'avons pas pu nous y rendre à cause des conditions météorologiques).

Figure 6 : Récapitulatif de la communication dans le recrutement des élevages.

113 Haras « sains »	30 élevages « atteints »
• Objectif : 8 haras → appel des 42 premiers de la liste • 9 sans correspondance de vétérinaire référent dans la BDD autopsies ANSES-Dozulé • 33 avec correspondance vétérinaire référent • 9 éliminés car suspicion ou diagnostic par le vétérinaire • 24 toujours « sains » après appel du vétérinaire • 3 ne répondent pas • 2 refusent de participer • 1 éliminé car élève des poneys Shetland • 3 nous annoncent des cas dont le vétérinaire n'a pas parlé • 2 éliminés • 1 avec de nombreux cas bien documentés → H10 • 15 volontaires pour participer	• Objectif: 20 haras • 1 dont le vétérinaire référent d'après la BDD ANSES-Dozulé n'y exerce plus • 29 ont un vétérinaire référent dans la BDD ANSES-Dozulé • Refus d'un vétérinaire de contacter les 2 élevages de sa clientèle présents sur notre liste • 1 haras éliminé car changement récent de propriétaire • 1 refus par le responsable du haras • 3 haras avec peu de cas • 9???? • 13 VISITABLES • 5 visités • 9 n'ont pu être visités car pas de date possible entre disponibilité éleveur et météo.

4.1.2. Chronologie des séances de prélèvements

Le climat de l'été 2012 ayant été très défavorable, nous n'avons pas pu visiter le nombre de haras que nous avions prévu au début de notre travail, l'interprétation de nos résultats sera donc limitée par le nombre d'élevages.

Nous avons visité 11 élevages de chevaux en Basse-Normandie entre le 30 mai et le 24 août 2012. Parmi ces élevages, en début de saison de prélèvements, nous avons commencé par retourner dans les deux haras visités l'année dernière pour la mise au point de la méthode : un haras sain et un haras rencontrant chaque année des cas de pneumonies dues à *Rhodococcus equi* (PHILIPOT, 2012), en commençant par le haras sain. Ces deux visites avaient pour but d'harmoniser nos protocoles de prélèvements dans deux structures connaissant déjà le fonctionnement de nos appareils et de

comparer les résultats sur deux années consécutives. Nous sommes ensuite allés dans 9 haras dans lesquels aucune mesure de la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air n'avait été faite auparavant ; 3 haras sains et 6 contaminés suivant les critères définis précédemment (cf.3.1.1.1). Enfin, nous sommes retournés en fin de saison compléter nos mesures dans le haras contaminé visité pour la mise au point de la technique, car il répondait à l'ensemble de nos critères d'inclusion pour l'étude en cours.

Le choix de la date de notre passage dans les élevages se faisait en fonction des disponibilités des éleveurs et de la météo (cf. *supra*). Notre objectif était de visiter 20 haras atteints et 8 haras sains. Nous avons donc décidé de réaliser des grappes comprenant 2 à 3 haras atteints pour un haras sain. Cependant les disponibilités des éleveurs et les conditions météorologiques ont rendu ce fonctionnement impossible.

Après être retournés visiter les haras de l'étude de l'année dernière, nous avons commencé notre première grappe en incluant 3 haras atteints (H1, H2 et H3) puis un haras sain (H4), à cause des conditions météorologiques, cette première grappe s'est échelonnée sur un mois (du 1er au 29 juin 2012). Ensuite, toujours à cause des précipitations, nous n'avons pu retourner dans des élevages que le 23 juillet 2012. Suivant les disponibilités des éleveurs, voulant optimiser la fenêtre météorologique que nous avions, nous avons choisi de visiter deux haras sains à la suite (H5 et H6) le lundi et le mardi, pensant enchaîner 3 haras atteints du mercredi au vendredi, nous avons pu nous déplacer comme prévu le mercredi et le jeudi (H7 et H8), mais un orage local nous a empêchés de terminer notre grappe le vendredi. Au mois d'Août de nombreux éleveurs de notre liste n'étaient plus disponibles en vue de la préparation des ventes aux enchères et du sevrage des poulains, nous nous sommes déplacés deux fois le 10 août (H9) et le 24 août 2012 (H10).

4.1.3. Présentation des élevages visités

Nous allons maintenant réaliser une étude descriptive des haras que nous avons visités durant l'année 2012 par rapport aux facteurs de risques décrits dans la bibliographie.

4.1.3.1. Historique des cas de rhodococcose

Nous commençons par étudier l'historique des cas de rhodococcose pulmonaire sur les poulains entre les années 2009 et 2012. Le nombre de cas chaque année entre 2009 et 2011 nous a été communiqué par l'éleveur lorsque nous complétions le questionnaire en début de journée de prélèvement. Pour l'année 2012, nous avons rappelé chaque éleveur *a posteriori*, c'est à dire au début de l'année 2013 pour lui demander s'il avait eu des poulains atteints.

Tableau 5 : Historique des cas de pneumonie à *Rhodococcus equi* communiqués par l'éleveur au cours des trois années précédentes. Les cas 2012 ont été recensés par contact téléphonique entre janvier et février 2013. *Les valeurs de la colonne «Approximation de la prévalence » ont été calculées à titre indicatif en réalisant la somme des cas depuis 2009, divisée par 4 et par le nombre de naissances en 2012.

id_haras	Statut	Statut_modifie	cas_2009	cas_2010	cas_2011	Cas_2012	Approx prévalence*
T0	TEMOIN	TEMOIN	0	0	0	0	0%
R0	ATTEINT	ATTEINT	4	8	8	2	15%
H1	ATTEINT	ATTEINT	0	10	2	0	14%
H2	ATTEINT	ATTEINT	10	3	1	2	5%
H3	ATTEINT	ATTEINT	NR	2	1	0	3%
H4	TEMOIN	SPORADIQUE	0	0	0	1	1%
H5	TEMOIN	TEMOIN	0	0	0	0	0%
H6	TEMOIN	TEMOIN	0	0	0	0	0%
H7	ATTEINT	SPORADIQUE	2	0	0	0	1%
H8	ATTEINT	ATTEINT	1	1	1	0	3%
H9	ATTEINT	ATTEINT	4	8	8	2	15%
H10	ATTEINT	ATTEINT	3	4	3	1	8%
TOTAL			24	36	24	8	

En 2012, un cas de pneumonie due à *Rhodococcus equi* est survenu dans un haras sain (H4). Aucun cas n'avait été rapporté depuis que l'éleveur s'était installé dans cet élevage en 2001. Il y a des chevaux sur ces terres depuis 1937. Le poulain atteint a développé une hyperthermie (39,5°C), et une détresse respiratoire à l'âge de 2 mois. La numération formule sanguine montrait une leucocytose neutrophilique associée à une hyperfibrinogénémie. L'échographie pulmonaire a permis de mettre en évidence la présence d'un abcès pulmonaire volumineux à droite ; *Rhodococcus equi* a été isolé à partir d'un prélèvement des voies respiratoires (Lavage Trans-Trachéal). Après 3 semaines de traitement antibiotique spécifique contre *Rhodococcus equi* (association rifampicine et clarithromycine), l'état du poulain s'est nettement amélioré et l'abcès pulmonaire a diminué de taille au contrôle échographique ; le traitement a duré au total 5 semaines. Ces données cliniques correspondent aux critères de définition des cas que nous avons précédemment décrits et nous permettent de considérer que ce poulain a bien développé une pneumonie due à *Rhodococcus equi*. Ce haras ne peut donc plus être considéré comme sain pour l'année en cours. Le poulain est né d'une mère de 15 ans dont aucun des poulains précédents n'avait montré de signe de rhodococcose, le test du colostrum de la mère par réfractométrie (Colotest ®) a montré une teneur médiocre en immunoglobulines. Le poulain et sa mère vivaient dans un champ de 5 hectares avec 3 autres poulinières suitées au moment où les symptômes sont apparus.

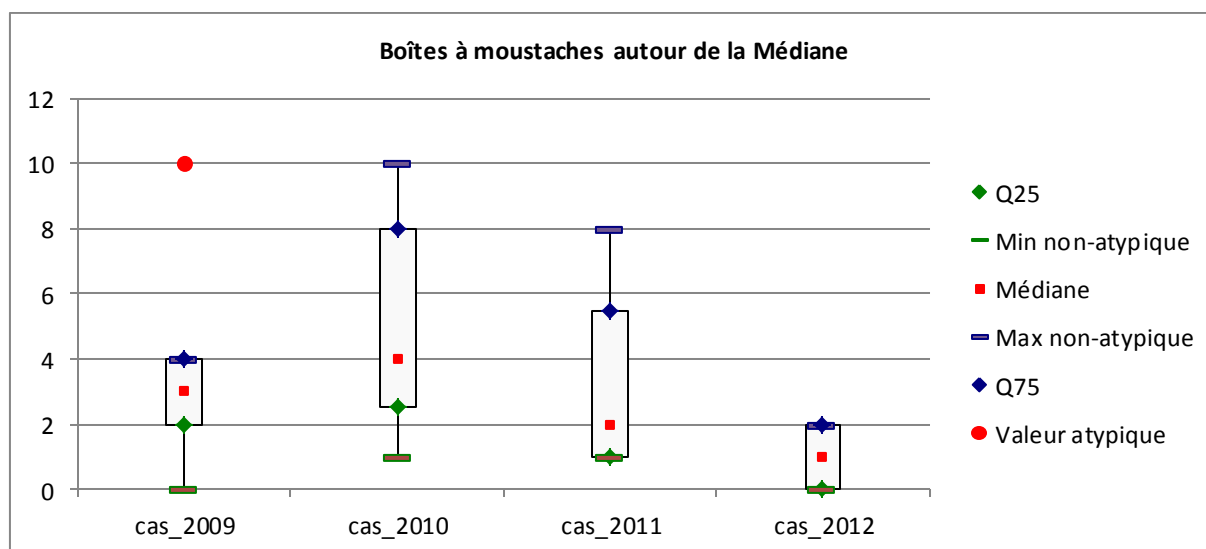
Dans l'élevage H7, les derniers cas ont été rapportés en 2009 (2 poulains atteints sur environ 40 naissances). Ceci nous a conduits à nous interroger sur la pertinence de classer cet élevage comme atteint.

Afin de comparer un lot de haras sains et un lot de haras atteints, nous avons décidé d'en retirer les haras H4 et H7 dont le statut ne peut être défini avec certitude. Nous avons regroupé ces deux élevages dans une nouvelle catégorie de haras présentant des cas « SPORADIQUES ». Le lot

« Témoin » est maintenant composé de 3 haras, le lot « Atteint » de 6 haras et le lot « Sporadique » de 2 haras.

A partir de cette classification, nous pouvons comparer le nombre de cas par année dans les haras « ATTEINTS » de notre échantillon, depuis 2009.

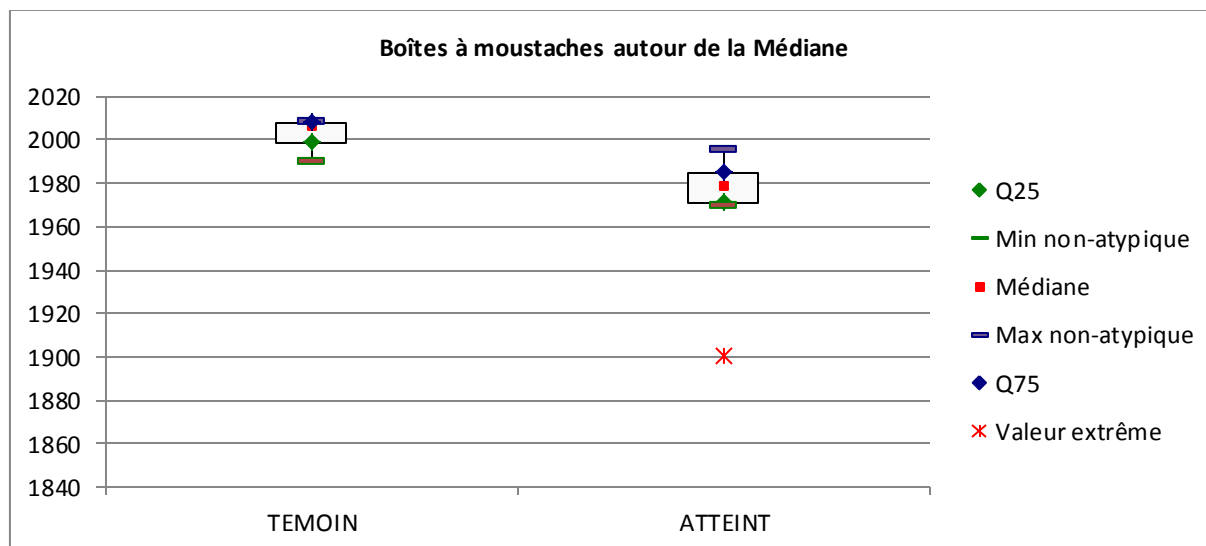
Figure 7 : Nombre de cas de rhodococcose pulmonaire dans les élevages atteints de notre échantillon pour les années 2009, 2010, 2011 et 2012.



Pour chaque année entre 2009 et 2011, nous comparons le nombre de cas présents dans les haras « ATTEINTS » de notre échantillon avec le nombre de cas pendant l'année 2012. Nous utilisons le test de Wilcoxon pour chaque comparaison. Les effectifs sont trop faibles pour admettre une distribution normale de la somme des rangs, nous nous reportons donc directement à la table de Wilcoxon, la valeur limite à 5% est 0, la plus petite somme des rangs calculée est inférieure ou égale à la valeur limite. On peut donc rejeter l'hypothèse nulle avec un risque d'erreur $p < 0,05$ pour chaque année 2009 à 2011 comparée à l'année 2012. Pour chaque année entre 2009 et 2011, comparée avec l'année 2012, les médianes des 2 séries étudiées sont donc significativement différentes au risque d'erreur $p < 0,05$. En admettant que le nombre de naissances dans chaque haras est à peu près constant chaque année entre 2009 et 2012, nous pouvons dire qu'il y a eu significativement moins de cas de pneumonies à *Rhodococcus equi* dans les élevages atteints de notre échantillon en 2012 par rapport aux années précédentes. Ceci confirme que l'année 2012 était une année particulière vis-à-vis de l'infection par *Rhodococcus equi* notamment du fait des fortes précipitations qui ont duré du mois de Mai au mois d'Août inclus en Basse-Normandie, ce qui a certainement permis de diminuer la quantité de poussières en suspension dans l'air.

4.1.3.2. Année de création des haras

Figure 8 : Année depuis laquelle les terres sont utilisées pour héberger des chevaux dans les haras témoins (n=3) et les haras atteints (n=6).



Dans notre échantillon, l'année de création médiane des haras témoins est 2006, l'année médiane de création des élevages atteints est 1978. Parmi les haras sporadiquement atteints, il y a des chevaux sur les terres depuis 1937 dans le haras H4 et depuis 1981 dans le haras H7.

4.1.3.3. Nombre de chevaux dans les haras visités

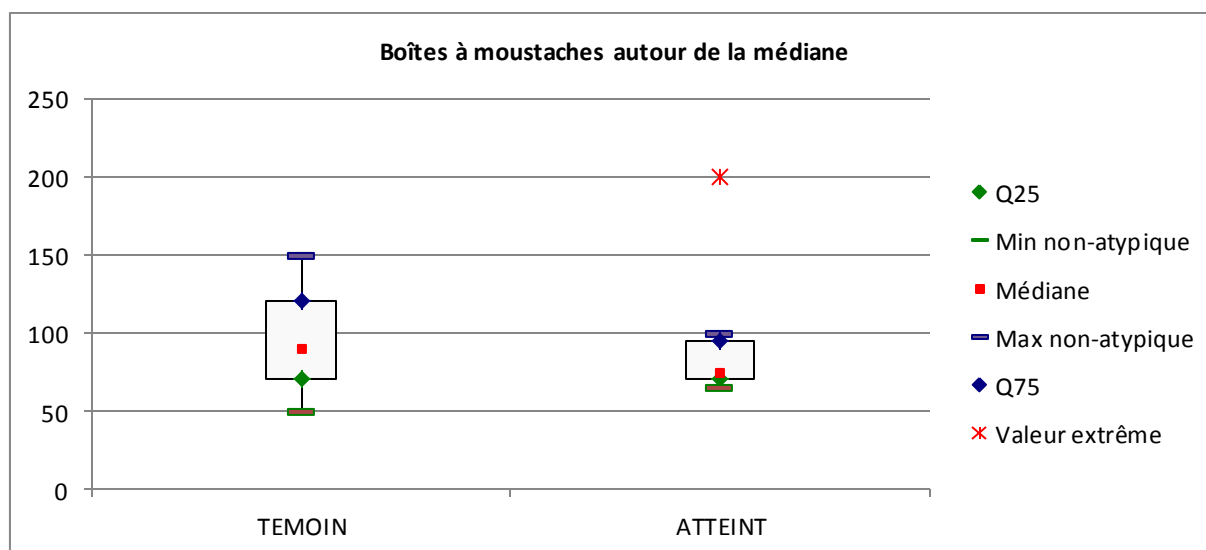
En Basse-Normandie, les élevages présentant plus de 15 naissances par an sont plus affectés par la rhodococcose que les élevages plus petits (TAPPREST *et al.*, 2012). Nous avons construit notre recrutement en n'incluant que des élevages de plus de 15 naissances par an afin de limiter le biais dû au nombre de naissances dans la comparaison entre les élevages sains et atteints.

Nous commençons par étudier le nombre total de chevaux présents dans chaque haras pour avoir une indication de la taille de la structure. Le nombre total de chevaux comprend les poulinières, leurs poulains des années précédentes, les animaux à l'entraînement sportif, les étalons présents sur le haras.

Tableau 6 : Composition des haras visités. Les Haras T0 et R0 sont respectivement le haras sain et le haras atteint qui avaient participé à l'étude ayant permis la mise au point de la technique de prélèvements (PHILIPOT, 2012) ; le haras H9 correspond au haras R0 dans lequel nous sommes retournés en fin de saison. *STH = Surface Toujours en Herbe

id_haras	Statut_modifie	date visite	année creation	race	effectif	nbre de poulains 2012	STH* dédiée aux chevaux
T0	TEMOIN	30/05/2012	1990	PS	50	15	55
R0 – H9	ATTEINT	31/05/2012 – 10/08/2012	1892	PS	70	37	50
H1	ATTEINT	01/06/2012	1995	TF	100	21	125
H2	ATTEINT	20/06/2012	1985	TF	200	80	120
H3	ATTEINT	28/06/2012	1982	PS	70	25	72
H4	SPORADIQUE	29/06/2012	2001	TF	160	20	150
H5	TEMOIN	23/07/2012	2006	PS	90	35	120
H6	TEMOIN	24/07/2012	2008	SF	150	52	35
H7	SPORADIQUE	25/07/2012	1981	TF	220	41	110
H8	ATTEINT	26/07/2012	2004	PS	65	24	85
H10	ATTEINT	24/08/2012	1996	PS	80	34	70

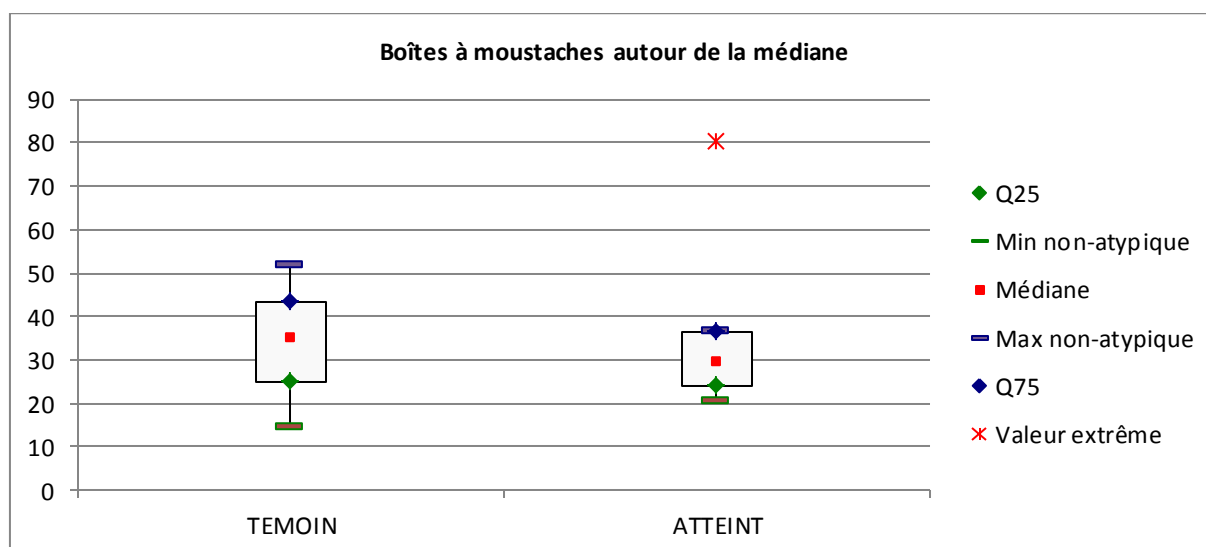
Figure 9 : Nombre de chevaux dans les élevages témoins et atteints.



La médiane du nombre total de chevaux est de 90 dans les haras TEMPOIN et 75 dans les haras ATTEINT. Le nombre de haras dans l'échantillon est trop faible pour réaliser un test de Mann-Whitney. L'élevage atteint H2 présente un nombre de naissances atypique par rapport aux autres élevages du lot ATTEINT. Les deux élevages de la catégorie SPORADIQUE comprennent 160 et 220 chevaux, ce sont donc deux élevages très peuplés en comparaison des autres élevages de notre échantillon.

Après avoir étudié le nombre total de chevaux présents sur le haras. Nous étudions ainsi la taille de la population sensible à l'infection par *Rhodococcus equi*.

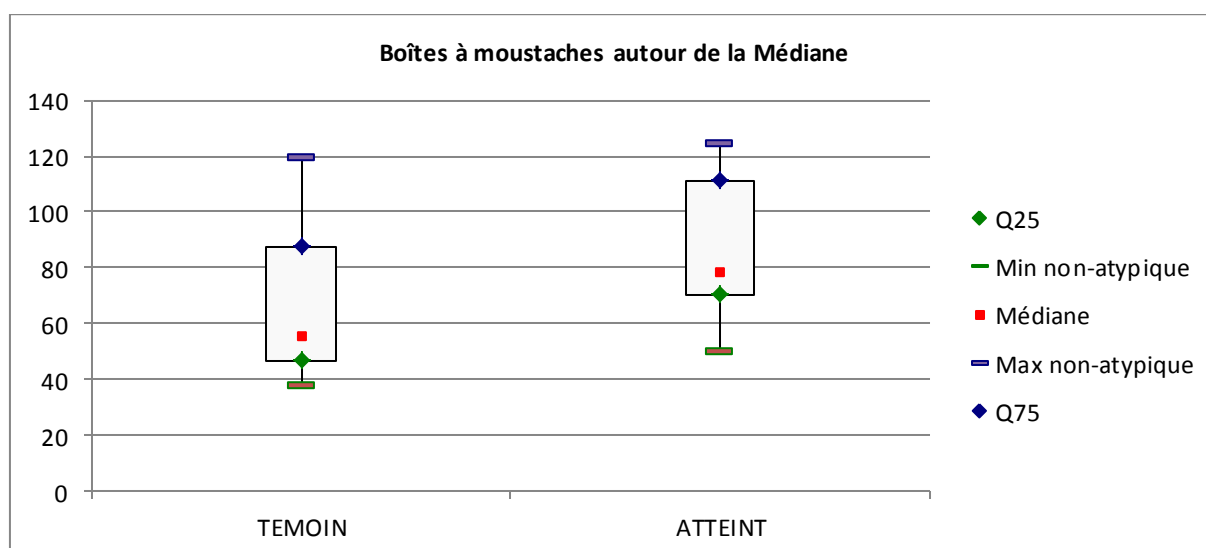
Figure 10 : Nombre de poulains présents en 2012 dans les élevages témoins et les élevages atteints.



La médiane du nombre de poulains en 2012 dans les haras témoins est de 35 poulains et 29,5 poulains dans les haras atteints. Dans l'élevage H4 il y a eu 20 poulains en 2012, et 41 dans l'élevage H7. Il ne semble pas y avoir de différence dans le nombre de poulains dans les élevages de notre échantillon mais le nombre d'élevages étudiés est trop faible pour réaliser un test de Mann-Whitney. Dans notre échantillon composé uniquement de haras de grande taille (plus de 15 naissances par an), nous n'observons pas de différence dans le nombre de chevaux ou de poulains entre les haras témoins et les haras atteints.

4.1.3.4. Surface des haras et densité des poulains

Figure 11 : Surface Totale en Herbe dans les haras témoins (n=3) et les haras atteints (n=6).

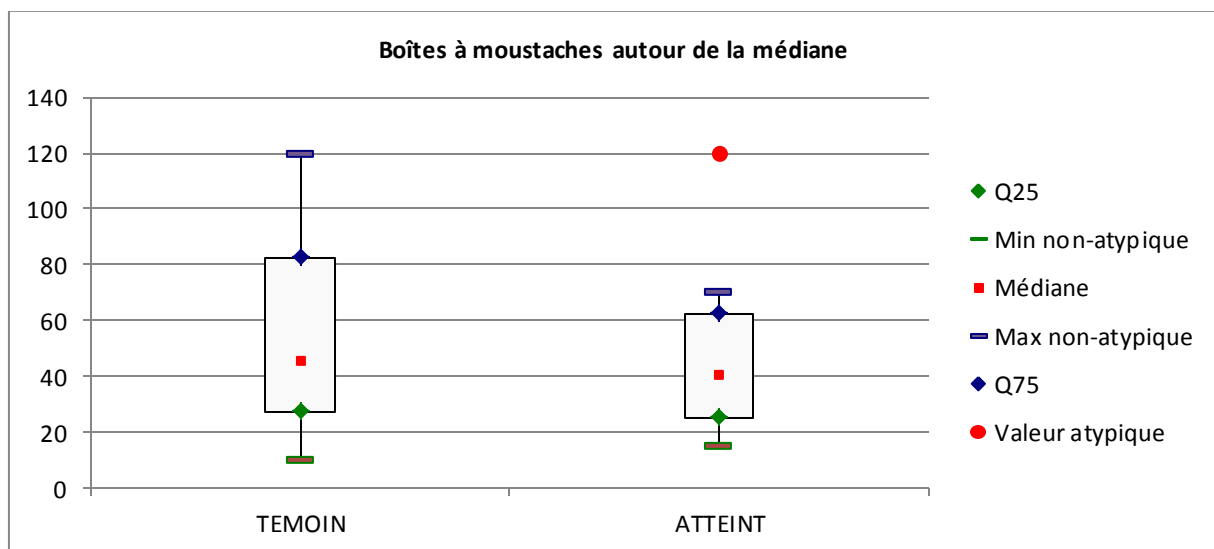


Nous désignons comme la Surface Totale en Herbe (STH) la surface sur laquelle les chevaux pâturent dans l'élevage. La STH médiane dans les haras témoins est de 55 ha et de 78,5 ha dans les

haras atteints. Le haras H4 a une STH de 150 ha et le haras H7 une STH de 110 ha. Nous pouvons noter le cas du haras H6, dans cet élevage, les chevaux évoluent sur les 38 hectares autour des bâtiments, plus loin, il y a 35 hectares de marais qui ne sont utilisés que pour la fabrication du fourrage (foin de prairie). La surface totale des haras ne semble pas différente entre les élevages du lot témoin et les élevages atteints dans notre échantillon, toutefois le faible nombre de haras ne nous permet pas de réaliser un test statistique.

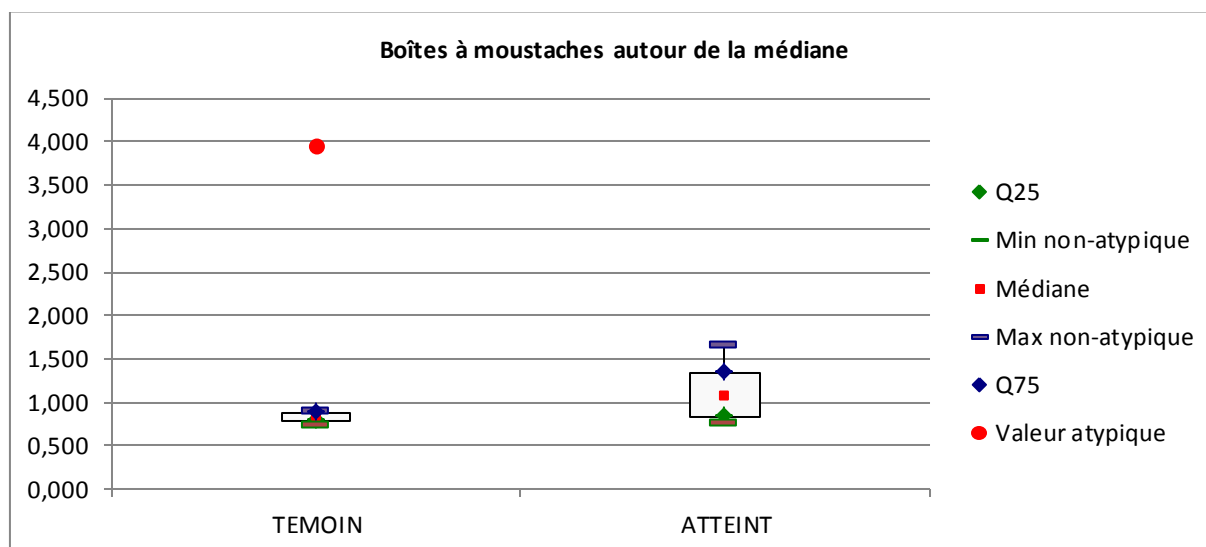
Certains haras comprennent une activité d'entraînement en plus de l'élevage. Une partie de la STH est donc utilisée pour les chevaux à l'entraînement ; dans tous les élevages que nous avons visités, les chevaux à l'entraînement et les poulinières n'évoluent pas sur les mêmes surfaces. Nous pouvons donc nous intéresser à la surface dédiée aux poulinières dans les élevages de notre échantillon.

Figure 12 : STH dédiée à l'élevage dans les haras témoins (n=3) et les haras atteints (n=2).



La médiane de la STH dédiée à l'élevage est de 45 hectares dans les haras témoins et 40 dans les haras atteints. Dans les élevages sporadiques, la STH consacrée aux poulinières est de 100 ha dans le haras H4 et 60 ha dans le haras H7.

Figure 13 : densité des chevaux dans les élevages témoins (n=3) et atteints (n=6) calculée en divisant le nombre total de chevaux par la Surface Totale en Herbe (STH) du haras

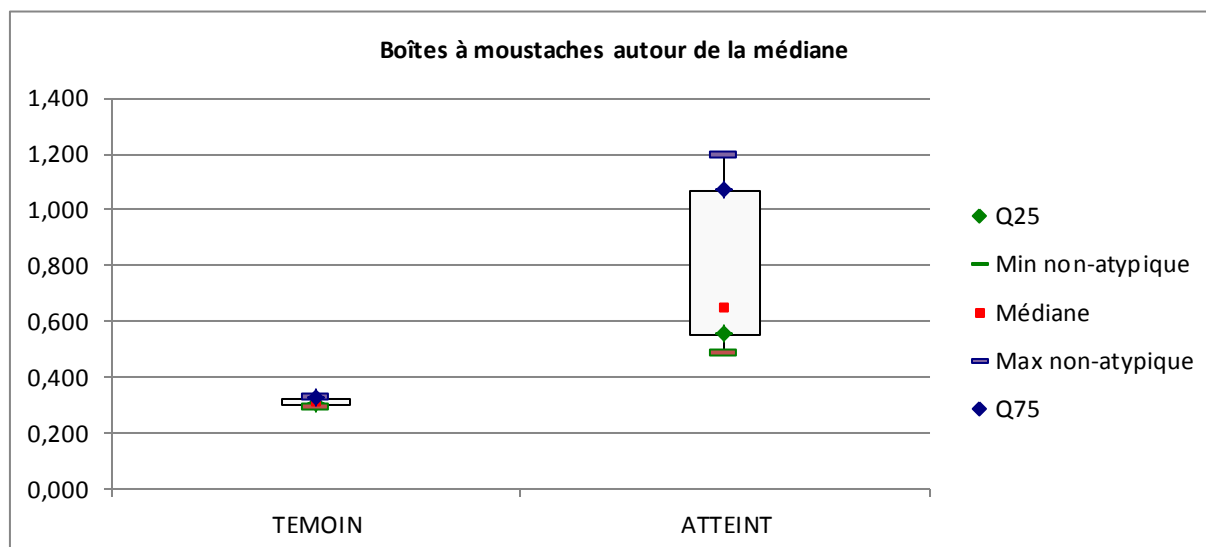


Parmi les trois haras atteints, le haras H6 présente une densité de chevaux beaucoup plus élevée que les autres élevages de notre échantillon (3,94 chevaux par hectare) ; cet élevage mis à part, la plus forte densité observée dans notre échantillon est de 2 chevaux par hectare dans le haras H7. La boîte à moustache correspondant aux haras témoins ne regroupe donc que deux haras (T0 et H5). Le système d'élevage dans le haras H6 est unique dans notre échantillon ; les 150 chevaux présents pâturent sur seulement 38 hectares, il y a à quelques kilomètres de l'élevage 35 ha de parcelles uniquement utilisées pour fournir du fourrage (foin de prairie). Dans ce haras, il y a 15 poulinières résidentes et 50 poulinières de passage au cours de la saison. Les poulains résidents sont sortis en lot sur un herbage de 5 hectares, les poulains de passage sont sortis alternativement sur un seul paddock proche des bâtiments d'élevage. Lorsque l'on retire le haras H6, les deux autres haras sains ont une densité inférieure ou égale à 0,90 cheval par hectare ; parmi les six haras atteints, 4 ont une densité strictement supérieure à 0,90 cheval par hectare (67 %). Parmi les haras sporadiques, le haras H4 a une densité de 1,07 cheval par hectare et le haras H7 2 chevaux par hectare.

Dans l'étude épidémiologique réalisée en 2005 par le laboratoire de l'ANSES-Dozulé (TAPPREST *et al.*, 2012), le seuil de densité des chevaux dans les élevages relié à la présence de cas de rhodococcose était de 1 cheval par ha (OR=3,50 [1,19 – 10,35] d'être un haras atteint quand la densité en chevaux est supérieure à 1,1 CV/ha). Dans notre étude, deux haras témoins sur les trois visités ont une densité inférieure à 1 CV/ha, trois haras atteints sur les six visités ont une densité supérieure à 1,1 CV/ha. Il n'y a pas de différence significative dans la répartition de la densité dans les élevages témoins et atteints par rapport au seuil de 1 (Test exact de Fisher, $p=0,6$).

Plus précisément que la densité de chevaux, nous pouvons étudier la densité des poulains dans les haras de notre échantillon.

Figure 14 : Densité des poulains dans les haras témoins (n=2) et atteints (n=6). Le haras H6 n'apparaît pas sur ce graphique en raison de son fonctionnement particulier, la densité des poulains y est de 5,2 par hectare.



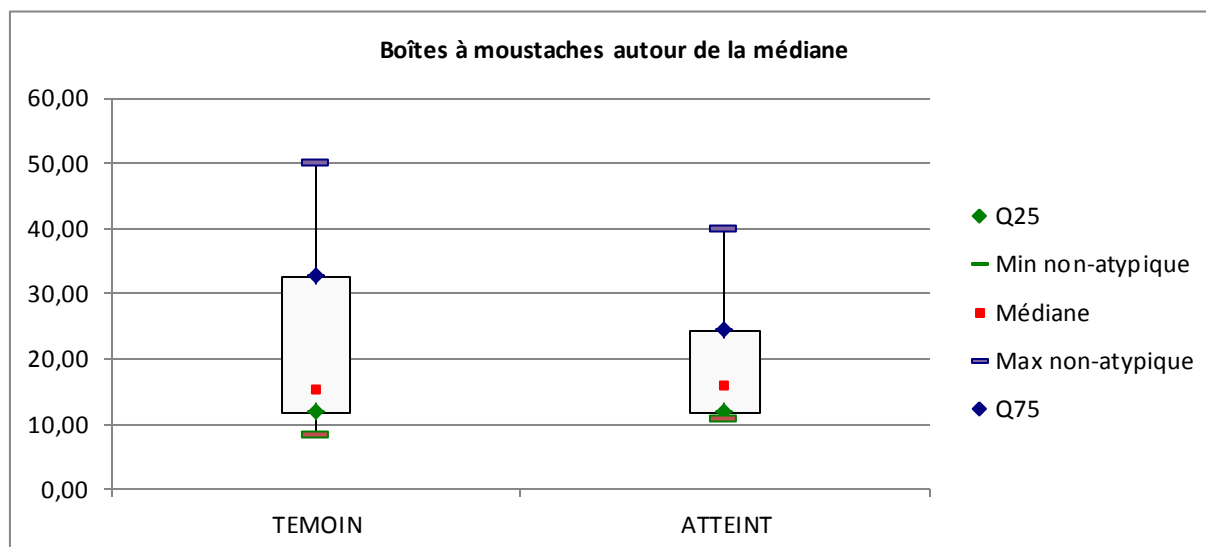
Dans notre échantillon la médiane de densité des poulains est de 0,31 poulain par hectare dans les haras témoins (sans le haras H6) et de 0,65 dans les haras atteints. Dans l'ensemble des élevages témoins visités, la densité des poulains est inférieure à 0,4 poulain/ha ; dans l'ensemble des élevages atteints visités, la densité est supérieure à 0,5 poulain/ha. Il y a une différence significative entre les élevages témoins et atteints dans la répartition de la densité des poulains par rapport au seuil de 0,4 poulain/ha (test exact de Fisher, $p < 0,012$).

4.1.3.5. Nombre de personnel dans le haras et estimation de la capacité d'accueil

Nous étudions le personnel travaillant sur chaque haras par rapport au nombre total de chevaux. Le personnel dans le haras en UTH comprend toutes les personnes travaillant avec les chevaux mais aussi les secrétaires le cas échéant, en considérant que leur travail dégage du temps pour les autres personnes présentes sur le haras pour les soins des chevaux. La répartition des employés dans les différents secteurs du haras (entraînement, élevage, entretien des espaces verts...) est sujette à trop de variations dans certains élevages pour nous permettre de classer les UTH par secteur, nous nous contenterons donc d'une vision globale de la structure.

La médiane du nombre de chevaux par rapport au personnel travaillant dans la structure est de 15 chevaux/UTH dans les haras témoins et 15,75 dans les haras atteints. Dans les haras sporadiques, le haras H4 est un des élevages dont une partie du personnel est exclusivement dédiée aux animaux d'élevage, il y a deux UTH soit 10 chevaux par UTH ; dans le haras H7, il y a 24 chevaux par UTH. Il ne semble pas y avoir de différence dans la charge de travail par personne entre les haras témoins et les haras atteints de notre échantillon, cependant le faible nombre de haras ne nous permet pas de conclure (Cf. Figure 15 ci-dessous).

Figure 15 : Nombre de chevaux divisé par le nombre d'UTH intervenant dans chaque élevage. Témoins (n=3) et atteints (n=6).



Lors du remplissage du questionnaire, nous avons demandé à chaque éleveur d'évaluer si sa structure pourrait accueillir plus de chevaux, si le nombre maximal de chevaux était atteint ou s'il était dépassé. Nous avons ensuite demandé quel était le critère qui limitait l'accueil de plus d'animaux le cas échéant (place dans les box, STH, nombre de personnel...).

Tableau 7 : Capacité d'accueil dans les haras de notre échantillon.

id_haras	Statut	nb_cv	cap_accueil	critere_limitant_accueil
T0	TEMOIN	50	ATTEINTE	HERBAGES
H5	TEMOIN	90	NON ATTEINTE	
H6	TEMOIN	150	ATTEINTE	HERBAGES
H4	SPORADIQUE	160	NON ATTEINTE	MAIN D'ŒUVRE
H7	SPORADIQUE	220	DEPASSEE	HERBAGE
R0 - H9	ATTEINT	70	ATTEINTE	MAIN ŒUVRE
H1	ATTEINT	100	NON ATTEINTE	BOXES
H2	ATTEINT	200	ATTEINTE	TOUS
H3	ATTEINT	70	ATTEINTE	HERBAGES
H8	ATTEINT	65	DEPASSEE	BOXES
H10	ATTEINT	80	ATTEINTE	BOXES

56 % (6/11) des éleveurs de notre échantillon estiment avoir atteint la capacité d'accueil de leur structure. La capacité d'accueil est atteinte ou dépassée dans 67 % des haras témoins (2/3) et dans 83 % des haras atteints (5/6). Il n'y a pas de différence significative entre les haras témoins et atteints (Test exact de Fisher, $p=0,93$). Parmi les haras sporadiquement atteints, la capacité d'accueil n'est pas atteinte dans le haras H4, elle est dépassée dans le haras H7.

4.2. Etude des principaux facteurs de risque de développement de rhodococcose pulmonaire dans les élevages de notre échantillon

4.2.1. Introduction d'animaux extérieurs au haras et mélange avec les animaux résidents

L'hébergement de poulinières extérieures n'appartenant pas au cheptel du haras est reconnu comme un facteur de risque d'apparition de rhodococcose pulmonaire chez les poulains. Nous allons donc comparer le nombre de haras accueillant des poulinières de passage dans notre échantillon.

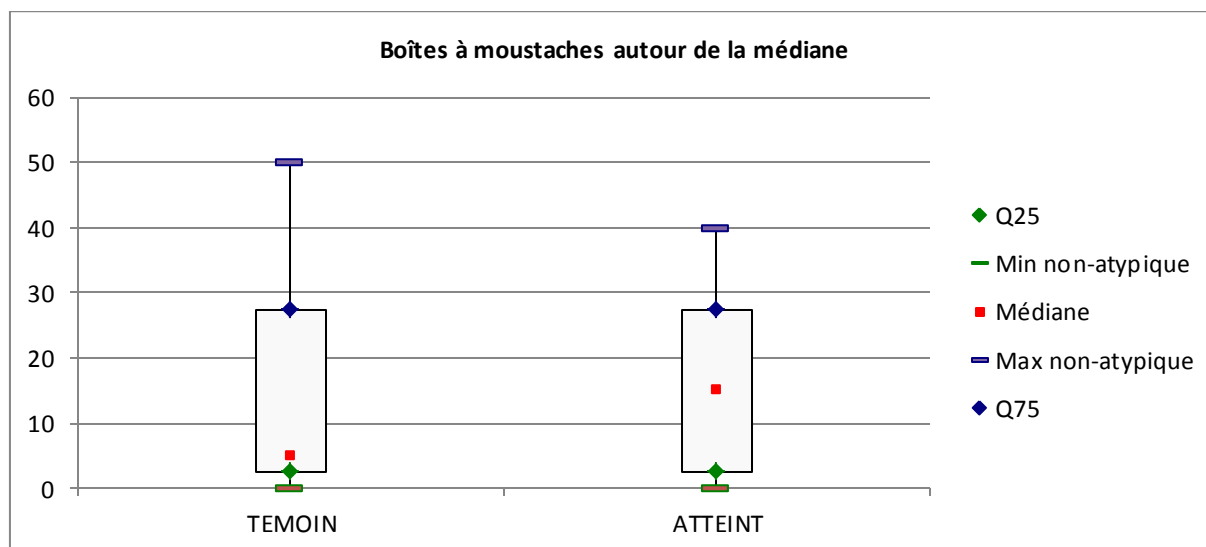
Tableau 8 : fréquence d'introduction de poulinières extérieures dans les haras témoins (n=3) et les élevages atteints (n=6) de notre échantillon.

<i>Introduction poulinières extérieures</i>	<i>NON</i>	<i>OUI</i>	<i>Total</i>
<i>TEMOIN (n=3)</i>	<i>33%</i>	<i>67%</i>	<i>100%</i>
<i>ATTEINT (n=6)</i>	<i>33%</i>	<i>67%</i>	<i>100%</i>

Dans notre échantillon, il y a la même proportion de haras du lot sain et du lot atteint qui accueillent des poulinières sur leur terres. Parmi les haras sporadiques, le haras H7 héberge des poulinières de passage ; dans le haras H4, il y a des poulinières qui passent sur le haras mais elles ne viennent que pour la saillie et n'empruntent pas le même circuit que les poulinières du haras. Le parking des visiteurs est à 20 mètres de la salle d'insémination, tous les sols entre le parking et l'insémination sont recouverts d'enrobés et fréquemment nettoyés, les poulinières repartent dès l'insémination effectuée. Nous ne considérons donc pas que ce haras héberge des poulinières extérieures.

Nous pouvons ensuite étudier le nombre de poulinières hébergées dans les haras du lot témoin et du lot atteint.

Figure 16 : Nombre de poulinières extérieures hébergées dans les haras témoins (n= 3) et atteints (n=6).



La médiane du nombre de poulinières extérieures hébergées dans les haras témoins (n=3) est de 5 ; dans les haras atteints (n=6) la médiane est de 15 poulinières extérieures hébergées. Dans le haras sporadique H7, 15 poulinières extérieures sont hébergées, dans le haras H4, de nombreuses poulinières extérieures passent chaque année mais elles ne viennent que le temps de l'insémination artificielle et ne sont pas hébergées sur la structure, à aucun moment elles ne sont mélangées avec les juments de l'élevage.

En 2005, lors de l'étude épidémiologique à large échelle réalisée en Basse-Normandie (TAPPREST *et al.*, 2012), la valeur seuil dans le nombre de poulinières extérieures accueillies dans les haras était de 20 poulinières, il y avait un fort lien statistique entre les haras accueillant 20 poulinières ou plus et les haras atteints de rhodococcose (OR=5,93 [2,23-15,78]). Dans notre échantillon, deux haras témoins sur les trois visités accueillent moins de 19 poulinières ; 3 haras atteints sur les six de notre échantillon accueillent 20 poulinières extérieures ou plus. Il n'y a pas de différence significative (Test exact de Fisher, p=0,6).

Lorsqu'un élevage accueille des juments suitées, le risque de contamination est plus présent quand les poulains extérieurs sont en contact direct proche avec les poulains de l'élevage (contamination par les bactéries expirées par un poulain porteur) ou lorsqu'ils sont en contact avec les crottins d'autres animaux. Dans l'ensemble des élevages visités, les box étaient bien séparés entre poulinières résidentes et poulinières extérieures, les risques de contamination par contact prolongé sont les plus élevés lorsque les animaux sont sortis sur les paddocks ou les champs.

Tableau 9 : Fréquence de mélange des poulinières extérieures et des poulinières résidentes sur les champs et les paddocks dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).

Mélange des poulinières extérieures et résidentes	NON	OUI	Total
ATTEINT (n=6)	50%	50%	100%
TEMOIN (n=3)	67%	33%	100%

Les paddocks et les champs ne sont pas partagés entre animaux extérieurs et animaux du haras dans deux des trois haras témoins visités, et dans 3 des 6 haras témoins visités. Vu le faible nombre de haras, nous utilisons le test exact de Fisher, nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse nulle avec un risque d'erreur $p < 0,05$, il semblerait donc que dans notre échantillon, les pâturages ne sont pas plus partagés entre animaux extérieurs et résidents dans les haras atteints par rapport aux haras témoins. Parmi les haras sporadiques, paddocks et herbages ne sont pas partagés dans le haras H4, ils sont partagés dans le haras H7. Dans l'étude épidémiologique menée en 2005, le partage des pâturages était un facteur de risque lié à la présence de cas de rhodococcose dans l'élevage ($OR=3,05$ [1,20 – 7,73]) (TAPPREST *et al.*, 2012).

Les poulinières suitées sont en général saillies dans les semaines suivant leur poulinafe afin d'avoir un poulain le plus tôt possible l'année suivante. Pour la mise à la reproduction, les poulinières sont manipulées fréquemment (suivi des chaleurs, soins gynécologiques, insémination...) pendant les premières semaines de vie de leur poulain, c'est-à-dire pendant une période où le jeune animal est le plus sensible à l'infection par *Rhodococcus equi*. Pour les soins gynécologiques, nous utilisons une « barre », ce dispositif permet la contention de la jument, et évite au vétérinaire qui se trouve derrière la jument de recevoir un coup de pied. Ce matériel ne peut être désinfecté ou nettoyé entre chaque animal en raison de la rapidité à laquelle les animaux y passent, mais tous les animaux du cheptel de reproduction y passent et parfois des animaux extérieurs. C'est donc un endroit où *Rhodococcus equi* peut se transmettre entre animaux. Nous avons donc étudié le partage des installations médicales entre poulinières de passage et résidentes dans les haras témoins et atteints.

Tableau 10 : Fréquence de partage des installations médicales dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6). Par défaut nous considérons que dans les élevages où il n'y a pas d'animaux de passage, il n'y a pas de partage du matériel.

Partage des installations médicales	NON	OUI	Total
ATTEINT (n=6)	33%	67%	100%
TEMOIN (n=3)	67%	33%	100%

Sur les trois haras témoins visités, il y en a un qui n'accueille pas d'animaux extérieurs (T0) ; parmi les deux qui hébergent des poulinières extérieures, il y en a un qui utilise les mêmes installations pour les animaux de passage et animaux résidents (H6). Deux tiers des haras atteints (4/6) utilisent les mêmes installations médicales pour les animaux de passage et résidents ; les deux haras qui n'utilisent pas les mêmes installations sont les deux haras qui n'accueillent pas de poulinières extérieures. Il n'y a pas de différence statistique entre les haras témoins et les haras atteints de notre échantillon d'après le test exact de Fisher ($p=0,52$). Dans les deux haras

sporadiques, les poulinières de passage sont examinées dans les mêmes endroits que les poulinières résidentes. Dans l'étude épidémiologique précédemment réalisée, le partage des installations médicales apparaissait comme un facteur de risque important de développer des cas de rhodococcose dans l'élevage (OR = 12,66 [3,49 – 46,25]) (TAPPREST *et al.*, 2012).

Photographie 6 : Barre de gynécologie.



4.2.2. Mesures de prophylaxie contre la rhodococcose et suivi de la santé des poulains

De nombreuses techniques de prophylaxie sont utilisées afin d'éviter l'infection des poulains par *Rhodococcus equi*, à commencer par la vaccination des poulinières et des poulains. Aucun des haras témoins de notre échantillon n'utilise de vaccination des poulinières contre *Rhodococcus equi*. Parmi les élevages atteints, les haras H2, H8 et H10 vaccinent les poulains. Le haras sporadique H7 vaccine les poulains depuis 4 ans avec un auto-vaccin fabriqué à partir d'une souche isolée sur un poulain mort de rhodococcose et autopsié en 2008.

Les poulains naissant à partir du mois de mai rentrent dans la période de sensibilité (à partir de 1 mois) au moment où les conditions météorologiques sont les plus favorables à l'aérosolisation de *Rhodococcus equi*, climat chaud et sec en Juin, Juillet et Août. Eviter les naissances dites tardives (entre mai et août) est recommandé pour lutter contre l'infection par *Rhodococcus equi* dans les

élevages atteints. Nous allons étudier la présence de naissances tardives dans les haras témoins et atteints de notre échantillon.

Tableau 11 : Fréquence des naissances après le mois de mai dans les haras témoins (n=3) et les haras atteints (n=6).

<i>Présence de naissances tardives</i>	<i>NON</i>	<i>OUI</i>	<i>Total</i>
<i>TEMOIN (n=3)</i>	<i>67%</i>	<i>33%</i>	<i>100%</i>
<i>ATTEINT (n=6)</i>	<i>17%</i>	<i>83%</i>	<i>100%</i>

Parmi les haras atteints, seul le haras H8 n'a pas de naissances tardives. Parmi les haras témoins, seul le haras H6 a des naissances tardives ; comme nous l'avons mentionné, le haras H6 est le seul haras élevant des chevaux de race Selle Français de notre échantillon. Dans cette race, les naissances sont souvent plus tardives que dans les élevages de chevaux de courses. Ceci s'explique par le fait que les chevaux de course sont qualifiés pour leur carrière sportive dès l'âge de deux ans, les éleveurs ont donc intérêt à avoir des poulains les plus précoces. En revanche la carrière des chevaux destinés au saut d'obstacle commence vers 3-4 ans, il y a donc moins d'intérêt pour les éleveurs à avoir des poulains plus précoces de quelques mois. Il n'y a pas de naissances tardives dans les haras sporadiques (H4 et H7). Il n'y a pas de différence significative dans la fréquence des naissances tardives entre les haras témoins et atteints de notre échantillon (test exact de Fisher $p=0,23$), cependant nous pouvons estimer que nous manquons de puissance statistique au vu du nombre de haras présents dans notre échantillon. Dans l'étude à large échelle menée en 2005 en Basse-Normandie, la présence de naissances tardives était statistiquement liée avec la présence de cas de rhodococcose dans le haras (OR = 4,90 [1,83 – 13,16]) (TAPPREST *et al.*, 2012).

L'immunité des poulains dans les premières semaines de vie est conférée par le passage d'anticorps maternels lors de la tétée du colostrum. La concentration du colostrum en anticorps peut-être testée par les éleveurs par réfractométrie à l'aide d'un COLOTEST®. Tous les haras témoins et sporadiques testent la concentration du colostrum ; 4 haras atteints sur 6 testent la qualité du colostrum ingéré par le poulain.

Photographie 7 : COLATEST® permettant de tester la concentration du colostrum en anticorps (crédit : Coveto ®).



La protection immunitaire des poulains dans les premiers jours de vie peut être testée rapidement dans les élevages en dosant les Immunoglobulines présentes dans le sang du poulain à l'aide d'un test rapide SNAP FOAL®.

Tableau 12 : fréquence de contrôle de la concentration sanguine du poulain en IgG dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).

<i>Contrôle de la concentration sanguine du poulain en IgG</i>	<i>NON</i>	<i>OUI</i>	<i>Total</i>
<i>TEMOIN (n=3)</i>	<i>0%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>ATTEINT (n=6)</i>	<i>33%</i>	<i>67%</i>	<i>100%</i>

Dans les trois haras témoins, le contrôle de la concentration en IgG dans le sang des poulains est réalisé régulièrement. Deux des six haras atteints n'utilisent pas régulièrement le contrôle de la concentration en IgG dans le sang des poulains ; parmi les quatre autres, trois nous ont spontanément expliqué qu'ils ne réalisent le contrôle dans le sang du poulain que lorsque la concentration déterminée dans le colostrum était insuffisante. Aucun des deux haras sporadiques ne contrôle la concentration sanguine en IgG sur les poulains. Il n'y a pas de différence de fréquence entre les haras témoins et atteints de notre échantillon (test exact de Fisher, $p=0,5$).

Photographie 8 : SNAP FOAL®, après avoir déposé un échantillon sanguin du poulain, un indicateur coloré nous indique la fourchette de concentration des IgG dans le sang du poulain (<400g/L : poulain immunodéprimé | 400-800 g/L : poulain douteux | >800g/L : poulain protégé). (crédit : www.pharma-animal.com)



4.2.3. Gestion de l'environnement des poulains

4.2.3.1. Qualité de l'environnement des bâtiments d'élevage

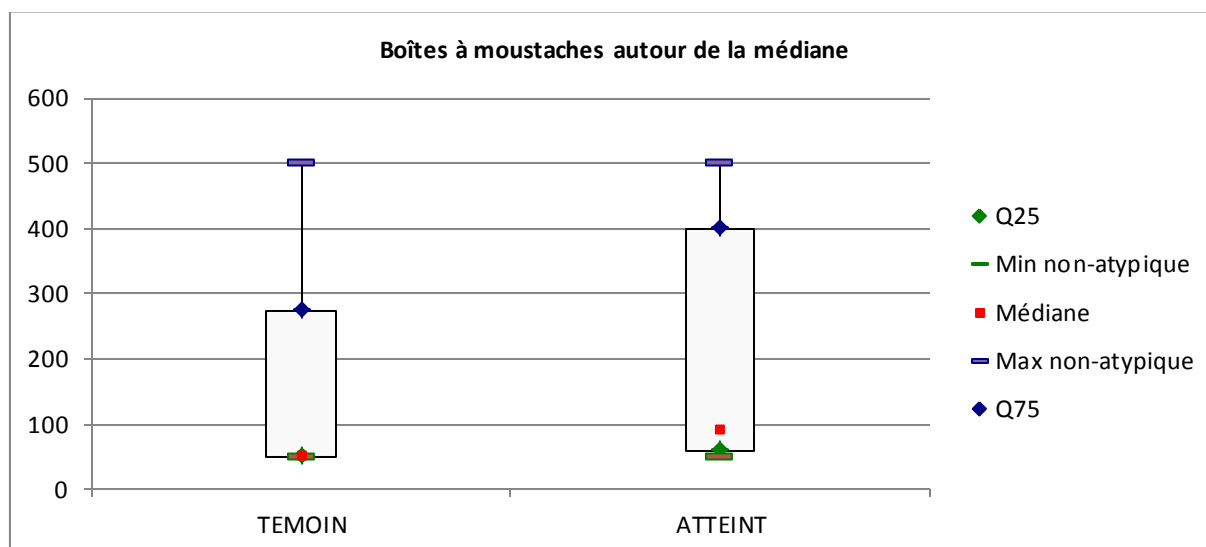
Rhodococcus equi est une bactérie ubiquiste isolée dans les terrains sur lesquels pâturent des herbivores. Il est actuellement admis que l'infection pulmonaire des poulains se fait par inhalation de poussières de l'environnement contenant la bactérie. Des techniques de gestion de l'environnement des poulains sont donc mises en place dans certains haras afin de limiter l'exposition des poulains à la bactérie.

Dans tous les élevages que nous avons visité, les poulinières suitées sont hébergées dans des box. Dans le haras H5, lorsque les poulains sont plus âgés, ils sont rentrés le soir dans des stabulations regroupant une à deux poulinières suitées.

Les box des poulinières suitées sont séparés de ceux des autres chevaux dans tous les élevages visités sauf dans le haras H6. Lors de l'enquête menée en 2005 (TAPPREST *et al.*, 2012), l'hébergement des poulinières dans des bâtiments séparés de ceux des autres chevaux du haras était apparu comme un facteur de risque statistiquement lié à l'**absence** de cas de rhodococcose (OR = 2,91 [1,09 – 7,94]).

Rhodococcus equi étant émis en grandes quantités dans les fèces des chevaux, le fumier représente une source potentielle d'infection. Nous avons estimé dans chaque élevage visité la distance en mètres séparant la fumière des bâtiments d'élevage.

Figure 17 : Distance entre le bâtiment hébergeant les poulains et la fumière dans les élevages témoins (n=3) et atteints (n=6).



Dans les trois haras témoins, la médiane de la distance entre la fumière et les box des poulinières est de 50 mètres, dans les haras atteints (n=6), la médiane est de 90 mètres. Il y a une très grande variabilité de ce paramètre dans chacun des deux lots. Parmi les haras sporadiques, dans le haras H4, la fumière est située à l'extrémité du couloir desservant les box, dans le haras H7, la fumière est à 500 mètres.

Parmi les trois haras témoins, le haras T0 et le haras H5 élèvent des chevaux de race Pur-Sang et ne possèdent pas de salle d'échographie ; le haras H6 qui héberge des chevaux Selle-Français possède une salle d'échographie, les enquêteurs ont jugé que celle-ci ne présente pas les conditions d'hygiène optimale, en particulier tenant à la poussière qui y était présente lors de notre visite. Tous les haras atteints visités (n=6) possédaient une salle dédiée aux examens gynécologiques et au suivi des juments par échographie, dans tous ces haras, les enquêteurs ont jugé que la salle était propre le jour de leur visite. Les deux haras sporadiques élèvent des Trotteurs Français, le haras H4 possède une salle d'échographie propre, dans le haras H7 le suivi échographie est réalisé devant les boxes des poulinières, dans un environnement riche en poussières.

Le suivi échographique des juments est réalisé par le vétérinaire dans tous les élevages visités, lors du passage du praticien, toutes les juments sont donc passées à la suite, accompagnées par leur poulain. Il y a donc un risque de contamination à cette occasion où tous les poulains de l'élevage passent par le même endroit, en particulier si l'aire d'attente devant la salle d'échographie est en terre.

Tableau 13 : Fréquence de présence d'une aire d'attente en terre devant la salle d'échographie dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6)

Présence d'une aire d'attente en terre devant la salle d'échographie	NON	OUI	Total
TEMOIN (n=3)	100%	0%	100%
ATTEINT (n=6)	50%	50%	100%

Aucun des haras témoins de notre échantillon ne présente une aire d'attente en terre devant la salle d'échographie. Parmi les six haras atteints visités, 3 possèdent une aire d'attente en terre. Il n'y a pas de différence significative dans notre échantillon (test exact de Fisher, $p=0,46$), cependant nous manquons de puissance statistique du fait du faible nombre de haras visités. Dans le haras sporadique H4, il n'y a pas d'aire d'attente en terre devant la salle où sont réalisés les suivis et les soins gynécologiques ; dans le haras H7, les échographies sont réalisées sur une aire bétonnée à l'entrée des bâtiments des box, avant d'arriver à cette aire, les juments et les poulains passent par une aire riche en poussière.

Lors de l'enquête à grande échelle menée en 2005 (TAPPREST *et al.*, 2012), la présence d'une aire en terre devant la salle d'échographies était un facteur de risque très fortement corrélé à la présence de cas de rhodococcose dans l'élevage (OR = 3,21 [1,91 – 18,22]).

A la fin de la journée de prélèvement, les enquêteurs ont estimé si l'environnement des poulains était poussiéreux ou non. L'objectif de cette classification était de présager de la qualité globale de l'environnement des poulains au cours de la saison en fonction de l'organisation du haras.

Tableau 14 : Fréquence d'environnement poussiéreux des poulains dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).

Environnement des poulains poussiéreux	NON	OUI	Total
TEMOIN (n=3)	67%	33%	100%
ATTEINT (n=6)	33%	67%	100%

Parmi les trois haras témoins visités, seul le haras H5 présentait une grande quantité de poussières dans l'environnement des poulains (dans les boxes, devant les bâtiments d'élevage, et les allées desservant les pâtures). Parmi les 6 haras atteints visités, quatre présentent un environnement poussiéreux pour les poulains, les haras R0-H9 et H8 présentent un environnement de bonne qualité pour les poulains. Il n'y a pas de différence significative entre les haras témoins et atteints (Test exact de Fisher, $p=0,52$). Dans le haras sporadique H7, tout l'environnement des poulains est poussiéreux. Dans le haras H4 sporadique, les poulains sont dans un environnement peu poussiéreux dans leurs premières semaines de vie (box propres en allées recouvertes d'un enrobé fréquemment nettoyé) ; en revanche, dès l'arrivée des beaux jours, les poulains sont sortis au champ jour et nuit, ces champs sont composés d'un paddock en sable comprenant un abri paillé, qui communique avec un champ d'environ 5 ha.

L'enquête épidémiologique réalisée en 2005 (TAPPREST *et al.*, 2012), montre qu'un environnement poussiéreux pour les poulains est un facteur de risque statistiquement plus retrouvé dans les haras atteints (OR = 3,21 [1,28 – 8,08]).

4.2.3.2. Qualité de l'environnement dans les box

Dans les élevages visités, les poulains naissent tous dans des box, ils y restent les premiers jours de leur vie. Les semaines suivantes, les poulinières suitées sont sorties la journée (dans un paddock ou un champ) et sont rentrées dans les box pour la nuit. Les box sont donc un lieu où les jeunes poulains peuvent être exposés à *Rhodococcus equi*.

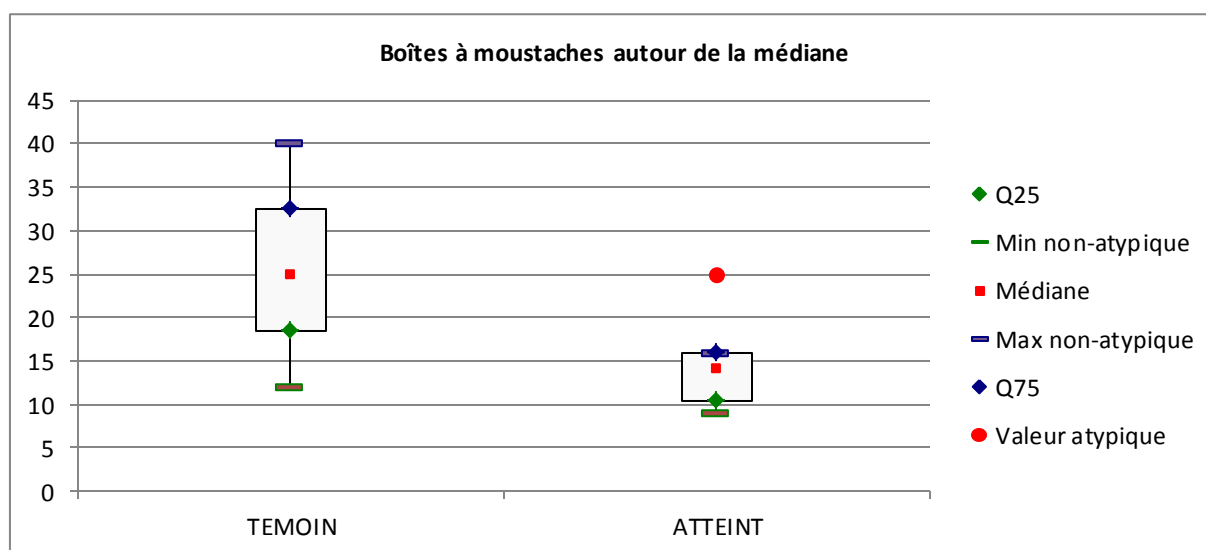
Parmi les haras du lot témoin, dans le haras T0 les box sont des pièces cloisonnées jusqu'au plafond dont la seule ouverture donne sur l'extérieur, dans ces installations, les poulains ne respirent donc pas l'air venant des box voisins, ce qui limite les risques de contagion. Dans le haras H5, les box des poulinières, sont regroupés par 6 dans des bâtiments (deux rangées de trois boxes); pour chaque box trois cloisons pleines montent jusqu'au plafond du box, la cloison donnant sur le couloir central est pleine jusqu'à mi-hauteur puis grillagée jusqu'au plafond. Le plafond des box est utilisé pour stocker des rouleaux de foin. Dans le haras H6, les box des poulinières suitées sont regroupés dans un hangar ; trois cloisons sont pleines, d'une hauteur d'environ 2m50 (ne montant pas jusqu'au plafond du bâtiment), la dernière cloison donnant sur le couloir central est grillagée.

Parmi les haras atteints, il y a des box séparés dans les haras R0 – H9, H1, H3 et H8. Dans le haras H2 les box des poulinières sont regroupés sous un hangar, trois cloisons sont pleines d'une hauteur de 2m30 environ, la dernière est constituée par une barrière métallique. Dans le haras H10, les box sont regroupés dans des bâtiments (4 à 10 box par bâtiment), les parois des box sont pleines jusqu'à mi-hauteur, puis grillagées jusqu'au plafond.

Dans les haras H4 et H7, les box des poulinières sont regroupés dans des bâtiments dédiés dont les cloisons sont pleines jusqu'à mi-hauteur puis grillagées. Nous noterons que le haras H4 est le seul dans lequel au moment de notre visite les poulains n'occupaient plus les box. Dans ce haras, les poulains passent les premières semaines de leur vie à l'intérieur exclusivement, puis dès que les conditions climatiques sont favorables, les poulinières suitées sont mises dans des champs comprenant un paddock en sable et un abri paillé.

Dans les haras témoins, la superficie médiane des box de poulinières suitées est de 25 m². Parmi les haras atteints, la médiane est de 14 m², le haras H3 représente une valeur atypique avec des box de 25 m². Dans les haras sporadiques, les box des poulinières suitées du haras H4 font 25 m², puis les abris paillés dans les champs font 80 m² ; dans le haras H7, les box des poulinières suitées font 8 m² en moyenne.

Figure 18 : Superficie des box dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



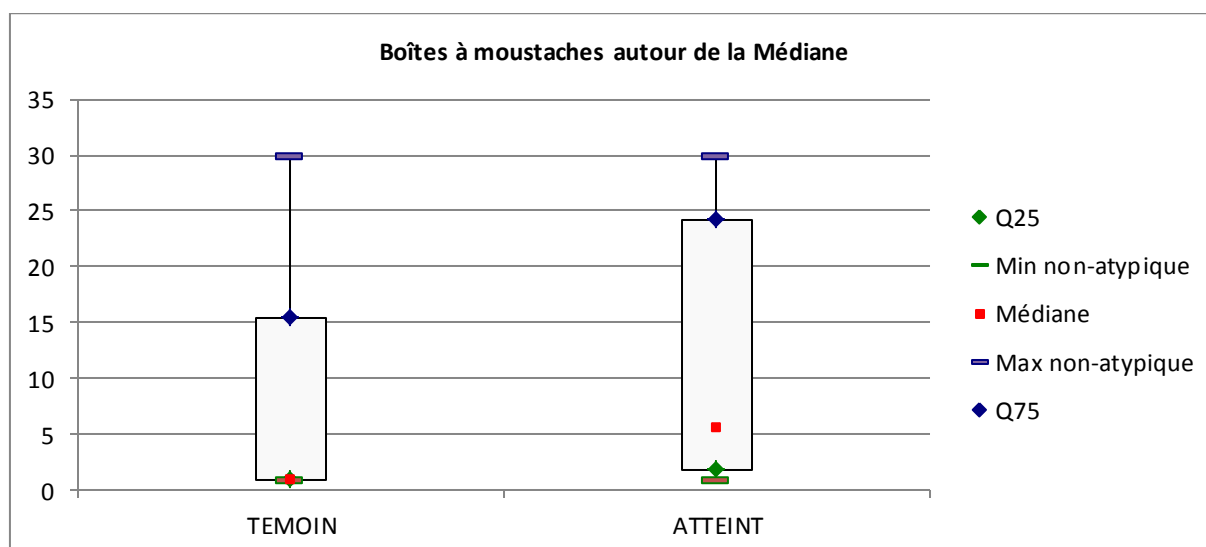
Dans tous les haras que nous avons visités, le sol des box est fait en béton. Ce sol est recouvert de litière, dans tous les haras visités la litière est composée de paille sauf dans le haras sain H5 où la litière est constituée de copeaux. Les enquêteurs ont évalué la propreté de la litière le jour de leur visite au début du prélèvement d'air dans le box. En pratique, cette évaluation a eu lieu entre 10h00 et 10h45 dans tous les haras visités excepté dans le haras T0 où l'organisation de notre journée de prélèvement nous a conduits à commencer le prélèvement d'air dans le box à 14h27. L'heure de début de prélèvement d'air dans le box laissait donc le temps au personnel des différents haras de curer les box avant notre mesure si cela était prévu.

Tableau 15 : Etat de la litière dans les haras du lot témoin (n=3) et atteint (n=6).

<i>Etat de la litière dans les box</i>	<i>PROPRE</i>	<i>SOUILLE</i>	<i>Total</i>
<i>TEMOIN (n=3)</i>	<i>67%</i>	<i>33%</i>	<i>100%</i>
<i>ATTEINT (n=6)</i>	<i>33%</i>	<i>67%</i>	<i>100%</i>

Dans 2 haras sains sur 3, la litière était propre, dans 4 haras atteints sur les 6 visités, les enquêteurs ont noté la présence de plusieurs crottins sur la litière. Il n'y a pas de différence significative entre les haras témoins et atteints de notre échantillon (Test exact de Fisher, $p=0,57$). Dans le haras sporadique H5, la paille présente dans l'abri du champ dans lequel nous avons réalisé nos mesures était souillée, dans le box étudié pour le haras H7, la paille était propre.

Figure 19 : Fréquence de retrait des crottins dans les box dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



La médiane de la fréquence de retrait des crottins dans les haras témoins est de 1 jour contre 5 jours pour les haras atteints de notre échantillon. Cependant vu la variabilité au sein des lots, il est impossible d'en supposer une différence entre les haras témoins et les haras atteints.

Tableau 16 : Fréquence de retrait des crottins dans la litière du box quand traité de manière binaire (au moins une fois par jour ou moins d'une fois par jour), dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).

<i>Retrait des crottins dans les box au moins une fois par jour</i>	<i>OUI</i>	<i>NON</i>	<i>Total</i>
<i>TEMOIN (n=3)</i>	<i>67%</i>	<i>33%</i>	<i>100%</i>
<i>ATTEINT (n=6)</i>	<i>50%</i>	<i>50%</i>	<i>100%</i>

Parmi les haras du lot témoin (n=3), deux retirent les portions souillées de la litière une fois par jour dans chaque box. Dans les haras atteints (n=6), trois retirent les crottins moins fréquemment qu'une fois par jour. Il n'y a pas de différence significative entre les haras témoins et les haras atteints de notre échantillon (test exact de Fisher, $p=0,6$). Dans les haras sporadiques, nous n'avons pas eu d'informations concernant les boxes dans le haras H4, mais dans les abris des champs, les crottins sont retirés quand l'éleveur le juge nécessaire ; dans le haras H7, les crottins sont retirés une fois par semaine.

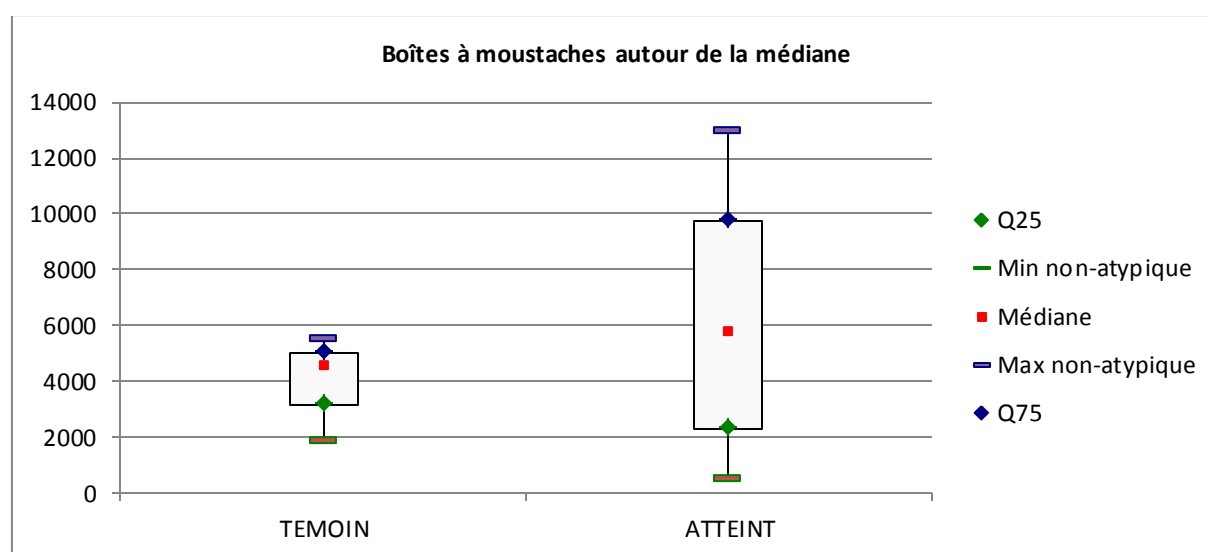
4.2.3.3. Qualité de l'environnement dans les paddocks

Les premières sorties des poulains sont réalisées dans des paddocks, les poulinières suivies y sont sorties les unes après les autres ou en petits groupes, ainsi de nombreux poulains de l'élevage passent sur ces surfaces. Nous avons effectué nos mesures en choisissant avec chaque éleveur un paddock dans lequel les jeunes poulains sortent chaque année, utilisé dans les jours précédant notre visite, présentant le plus de poussières par rapport aux autres paddocks de l'élevage et dans lequel des cas sont survenus le cas échéant.

Nous avons relevé la composition de la surface des paddocks dans les élevages visités. Le haras H1 (atteint) est le seul dans lequel le paddock n'était pas en herbe, dans ce haras, le paddock est en sable assez fin pouvant facilement s'aérosoliser lorsque le temps est sec. Dans l'étude menée en 2005, la présence de paddocks en sable pour les poulains était très fortement corrélée à la présence de cas de rhodococcose (OR = 4,97 [1,80 – 13,72]).

Nous commençons par comparer la taille des paddocks dans lesquels nous avons réalisé nos mesures et nos prélèvements dans les haras témoins et les haras atteints de notre échantillon.

Figure 20 : Surface du paddock utilisé dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



La médiane de la surface du paddock dans lequel nous avons réalisé les prélèvements est de 4 500m² dans les haras témoins et de 5 750m² dans les haras atteints. Le nombre de haras étudiés est trop faible pour réaliser le test statistique de Wilcoxon, cependant il ne semble pas y avoir de différence marquée entre les haras témoins et atteints. Dans les haras sporadiques, le paddock du haras H4 a une superficie de 450m² et 4 000m² dans le haras H7.

Une période de repos permet la régénération de l'herbe dans les paddocks et ainsi une diminution de la quantité de poussières pouvant s'élever du sol. De plus pendant une période sans animaux, le sol des paddocks n'est pasensemencé en *Rhodococcus* equi par les crottins. Pour chaque élevage, nous étudions la présence ou l'absence de période de repos pour les paddocks.

Tableau 17 : Fréquence de présence d'une période de repos pour les paddocks dans les haras visités témoins (n=3) et atteints (n=6).

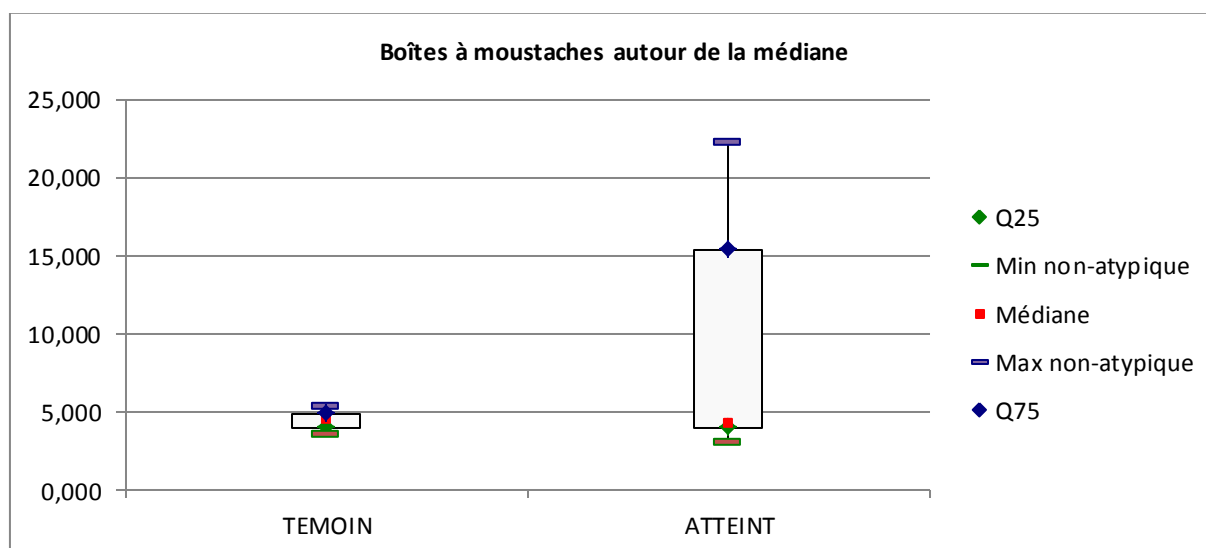
Période de repos des paddocks	NON	OUI	Total
TEMOIN (n=3)	0%	100%	100%
ATTEINT (n=6)	50%	50%	100%

Dans les trois élevages témoins visités, une période sans animaux est ménagée pour les paddocks ; une période de repos des paddocks est présente dans 50% (3/6) des haras atteints. Il n'y a pas de différence significative entre les haras témoins et atteints (test exact de Fisher, $p=0,46$). Dans l'élevage sporadique H4, une période de repos est respectée pour les paddocks, mais pas dans le haras H7.

Dans l'étude menée en Basse-Normandie en 2005 (TAPPREST *et al.*, 2012), l'absence de période de repos pour les paddocks et/ou les herbages était un facteur de risque très fortement corrélé à la présence de cas de rhodococcose dans l'élevage (OR = 3,81 [1,81 – 10,38]).

Nous allons maintenant étudier la densité maximale de poulinières suitées présentes simultanément dans les paddocks dans les élevages témoins et atteints.

Figure 21 : Densité des maximales en nombre de poulinières suitées par hectare dans les paddocks des haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



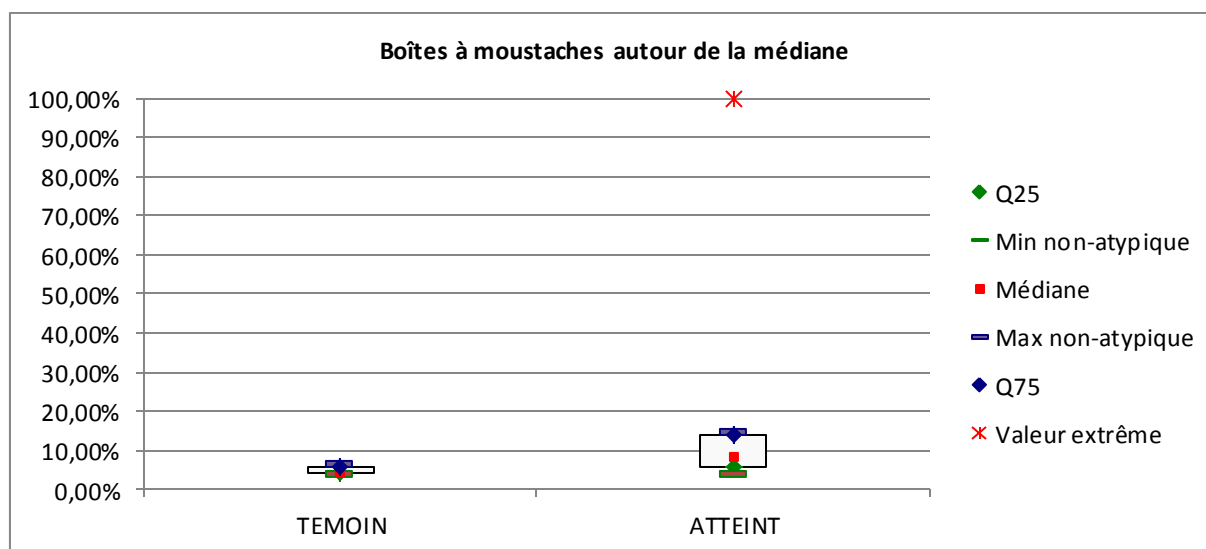
La médiane de densité maximale est de 4,4 poulinières par hectare dans les haras témoins (n=3), et de 4,2 dans les haras atteints (n=6). Dans les haras sporadiques, il y a 20 poulinières par hectare dans le paddock du haras H7, il y a 44,4 poulinières par hectare dans le haras H5. Cependant dans ce dernier haras, la situation est particulière car le paddock communique en permanence avec un champ de 5 hectares.

L'exposition des poulains à *Rhodococcus equi* est susceptible d'être majorée sur les surfaces comprenant plus de poussières, nous allons donc étudier la présence d'aires sans herbe par rapport à la surface du paddock.

Dans les paddocks de tous les élevages témoins et atteints visités, nous avons dénombré entre 2 et 6 aires sans herbes. Dans le haras H1, la totalité de la surface du paddock était dépourvue d'herbe. Les élevages de notre échantillon sont donc tous au-dessus du seuil établi dans l'enquête de 2005 de 1 aire sans herbe. En 2005, les élevages dans lesquels il y avait entre 2 et 4 aires sans herbe étaient statistiquement plus atteints de cas de rhodococcose (OR = 3,33 [1,30 – 8,35]).

Les mesures d'environnement présentées dans les graphiques suivants pour le haras R0-H9 sont les mesures de notre seconde visite (10Août 2012), lors de notre première visite, nous n'avions pas pu récolter *Rhodococcus equi* en aérosols sur le paddock et nous n'avions pas récolté d'échantillon pour la mesure du pH et de l'humidité de la terre dans le paddock et dans le champ.

Figure 22 : Médiane de la proportion d'aires sans herbe dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6)

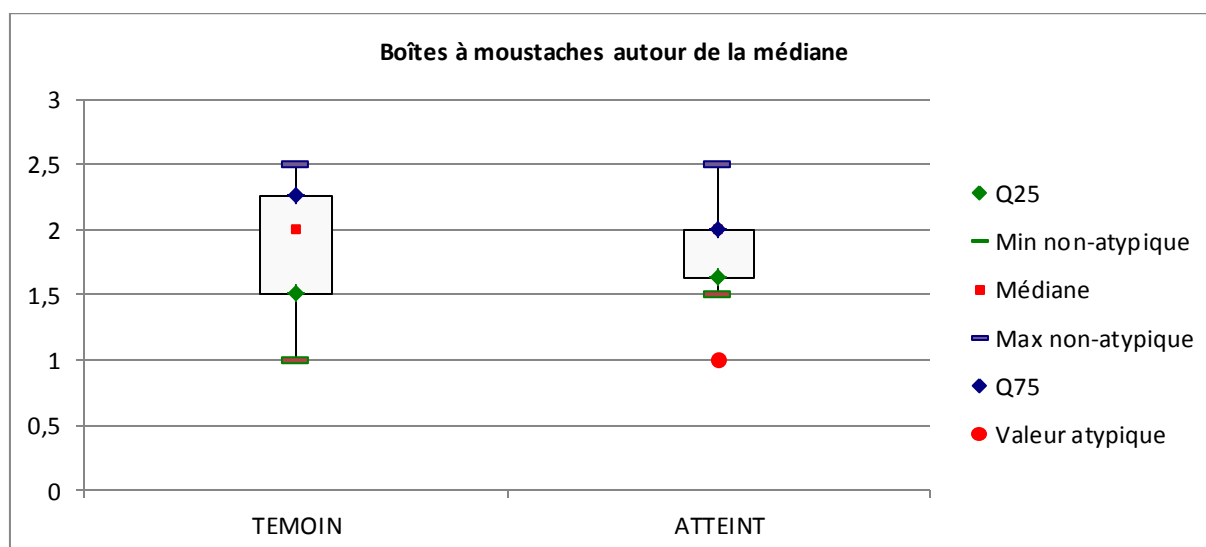


La médiane de la proportion d'aires sans herbe dans les haras témoins est de 4 %, dans les haras atteints, la médiane est de 8,5 % ; il y a une valeur atypique dans le lot des haras atteints : le haras H1 est le seul haras visité dans lequel le paddock utilisé pour les poulinières suitées est entièrement recouvert de sable. Dans le haras RO – H9, lors de notre visite du 31 mai 2012, il y avait 4% d'aires sans herbe dans le paddock, le 10 Août 2012, il y avait 10% d'aires sans herbe. Concernant les haras sporadiques, il y a 90 % d'aires sans herbe dans le haras H4 et 8 % dans le haras H7.

Les enquêteurs ont noté pour chaque paddock la quantité de poussières s'élevant du sol. La notation était réalisée sur une échelle de 1 à 5. La note 1 correspond à une absence totale de poussières visibles à l'œil nu, la note 2 correspond à la présence de quelques zones poussiéreuses sur la surface, la note 3 correspond à la présence de poussières soulevées uniquement par le passage des animaux, la note 4 correspond à la présence de grandes quantités de poussière au sol mais uniquement soulevée par le passage des animaux, la note 5 correspond à la présence de poussières soulevées uniquement par l'action du vent.

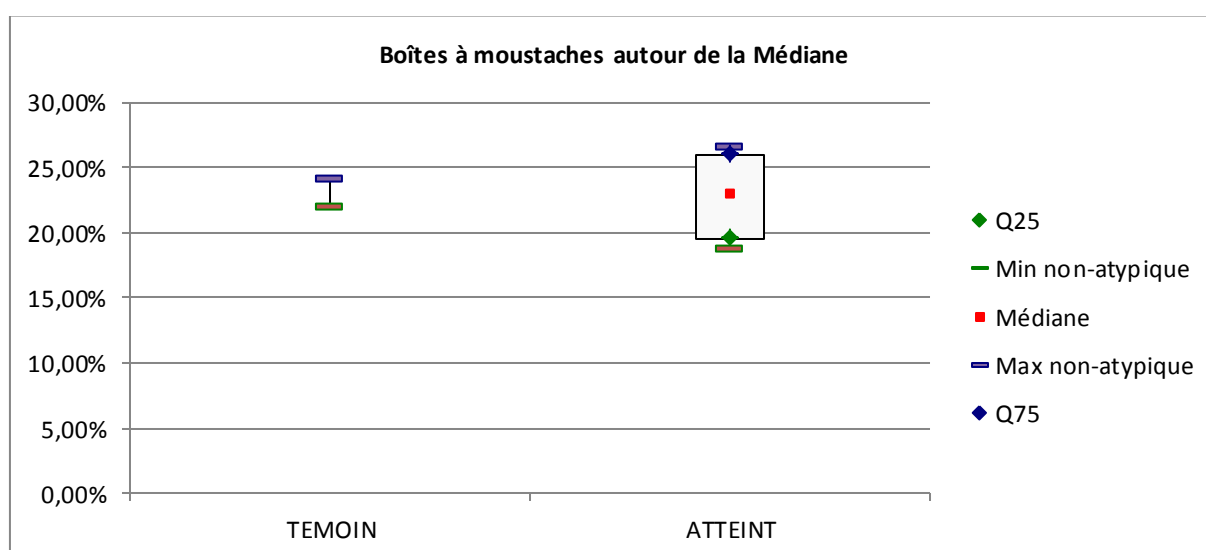
Dans le lot des haras témoins et atteints, la médiane de note de poussière est 2 ; dans le lot des haras atteints, le haras H2 représente une valeur atypique avec une note de poussière de 1. Dans les haras sporadiques, la note de poussière était de 2,5 dans le haras H4 et 1,5 dans le haras H7.

Figure 23 : Note de poussière dans les paddocks des haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



La notation de la quantité de poussière donne une indication de l'exposition des poulains, ainsi que de la probabilité de récolter *Rhodococcus equi* avec le CIP10 M le jour du prélèvement uniquement. Nous avons mesuré l'humidité de la terre dans les paddocks comme indicateur de l'exposition des poulains sur les jours précédents en admettant que plus la terre est sèche, plus la quantité de poussières dans l'air sera élevée. Nous avons mesuré l'humidité de la terre sur un échantillon de terre prélevé entre la surface et 5 cm de profondeur au milieu des paddocks. Cette mesure n'a pas pu être réalisée dans les haras T0, H1 et lors de notre première visite dans le haras R0-H9 pour des raisons techniques.

Figure 24 : Humidité de la terre dans le paddock pour les haras témoins (n=2) et les haras atteints (n=5). Le lot des haras témoins ne comprenant que 2 haras pour cette mesure, le maximum non atypique correspond au haras H5 et le minimum non atypique au haras H6.

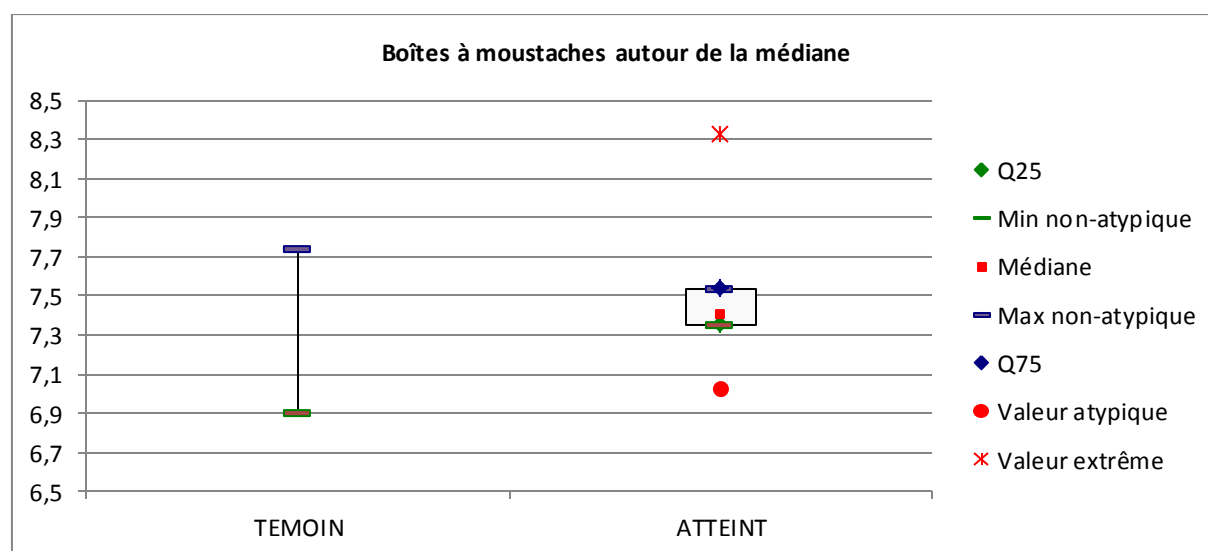


Dans les haras témoins, l'humidité était de 24,10% dans la terre du paddock du haras H4 et 22,00% pour le haras H6. Dans le lot des haras atteints, la médiane de l'humidité de la terre est de

22,90%. Dans le haras sporadique H4 nous avons relevé la plus faible humidité de la terre dans le paddock parmi tous nos prélèvements, 7,30% ; dans le haras H7, la terre du paddock avait une humidité de 24,75%. Le nombre de haras dans les lots témoins et atteints est trop faible pour permettre la réalisation d'un test statistique.

Le pH ayant une influence *in vitro* sur la croissance et l'expression du plasmide de virulence de *Rhodococcus equi*, nous avons mesuré le pH dans les paddocks où nous avons fait nos prélèvements. Le pH a été mesuré sur un échantillon de terre prélevé entre la surface et 5 cm de profondeur au centre du paddock. Cette mesure n'a pas pu être réalisée dans les haras T0, H1 et lors de notre première visite dans le haras R0-H9 pour des raisons techniques.

Figure 25 : pH de la terre dans le paddock pour les haras témoins (n=2) et les haras atteints (n=5). Le lot des haras témoins ne comprenant que 2 haras pour cette mesure, le maximum non atypique correspond au haras H6 et le minimum non atypique au haras H5.



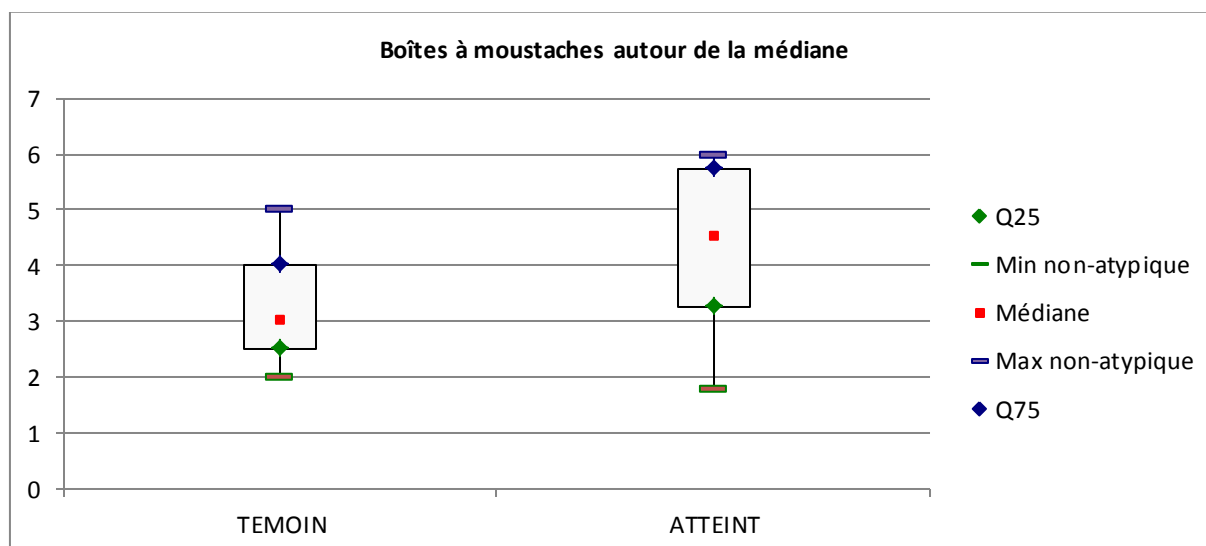
Dans les haras témoins (n=2), le pH est de 6,9 dans le haras H5 et de 7,74 dans le haras H6. Dans les haras atteints (n=5), le pH médian dans le paddock est de 7,4 ; dans le haras R0-H9, lors de notre seconde visite, le pH est de 8,32, dans le haras H2, le pH dans la terre du paddock est de 7,02. Dans les haras sporadiques, nous avons mesuré un pH de 7,1 dans le haras H4 et 7,67 dans le haras H7. Il ne semble pas y avoir de différence de pH dans la terre des paddocks entre les haras témoins et atteints, cependant le nombre de haras étudié est trop faible pour réaliser un test statistique.

4.2.3.4. Qualité de l'environnement dans les champs

Nous allons maintenant étudier la qualité de l'environnement des poulains dans le champ en étudiant les mêmes paramètres que ceux étudiés dans les paddocks. Pour chaque élevage visité nous avons choisi en accord avec l'éleveur un champ servant pour des poulains les jours précédant notre venue, ayant un maximum de poussières par rapport aux autres champs de l'élevage et dans lequel des cas de rhodococcose pulmonaire sont déjà survenus le cas échéant.

Nous commençons par étudier la surface du champ utilisé pour les prélèvements. En l'absence de plans précis pour chaque élevage, la superficie du champ était estimée en hectares par les enquêteurs et le propriétaire.

Figure 26 : Surface du champ dans les élevages témoins (n=3) et les élevages atteints (n=6).



Dans les élevages du lot témoin, la médiane de superficie du champ dans lequel nous avons réalisé nos prélèvements est de 3 ha, contre 4,5 ha dans les élevages atteints. Le nombre de haras témoins est trop faible pour réaliser un test de Wilcoxon, cependant il ne semble pas y avoir de différence de superficie entre les haras témoins et les haras atteints de notre échantillon. Dans l'élevage sporadique H4, le champ utilisé pour les prélèvements a une superficie de 4 ha, le champ dans l'élevage H7 a une superficie de 4,5 ha.

Nous allons maintenant étudier la présence d'une période de repos pour les champs dans les haras témoins et atteints.

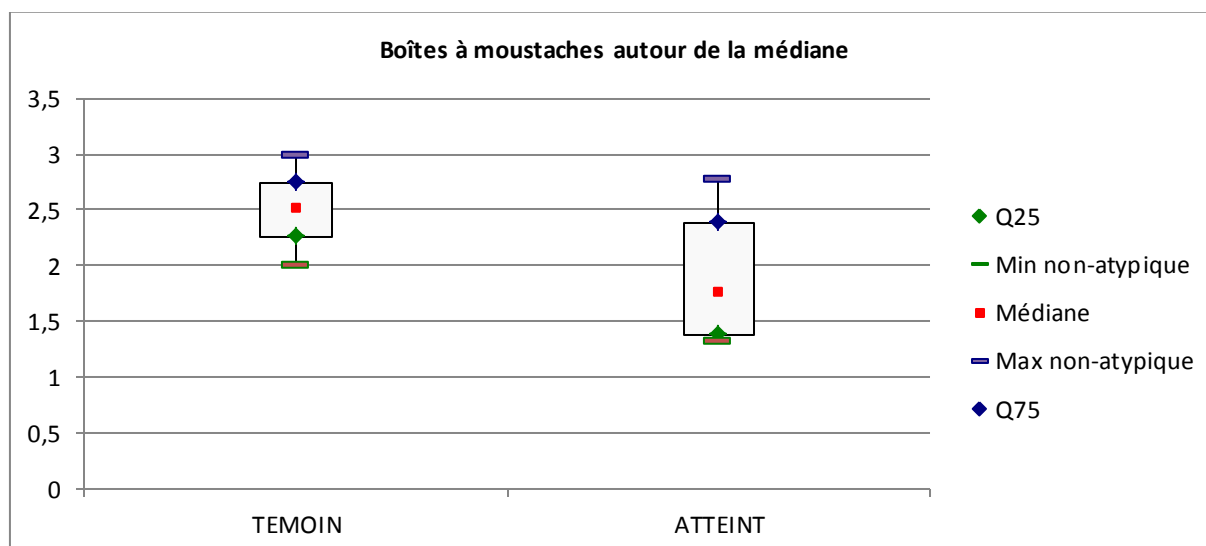
Tableau 18 : Fréquence de présence d'une période de repos pour les champs dans les haras visités témoins (n=3) et atteints (n=6).

<i>Période de repos des champs</i>	<i>NON</i>	<i>OUI</i>	<i>Total</i>
TEMOIN (n=3)	0%	100%	100%
ATTEINT (n=6)	33%	67%	100%

Dans tous les élevages témoins que nous avons visités, une période de repos est ménagée sur les champs. Parmi les six haras atteints visités, le haras R0-H9 et le haras H8 ne prévoient pas de période de repos des champs. Dans les deux haras sporadiques, il existe une période de repos. Il n'y a pas de différence significative entre les haras témoins et atteints (test exact de Fisher, $p=0,5$).

Nous étudions maintenant la densité maximale de poulinières suivées dans le champ, c'est-à-dire le nombre maximal de poulinières accompagnées de leur poulain présentes simultanément sur le champ.

Figure 27 : Densité maximale de juments suivées dans le champ dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



La médiane de la densité est de 2,5 juments suivées par hectare dans les haras témoins et 1,75 jument par hectare dans les haras atteints. Dans le haras H4, il y a une poulinière par hectare dans le champ, dans le haras H7 4,4 juments par hectare.

Tableau 19 : Densité maximale de juments suivées dans les champs par rapport au seuil de 2/ha.

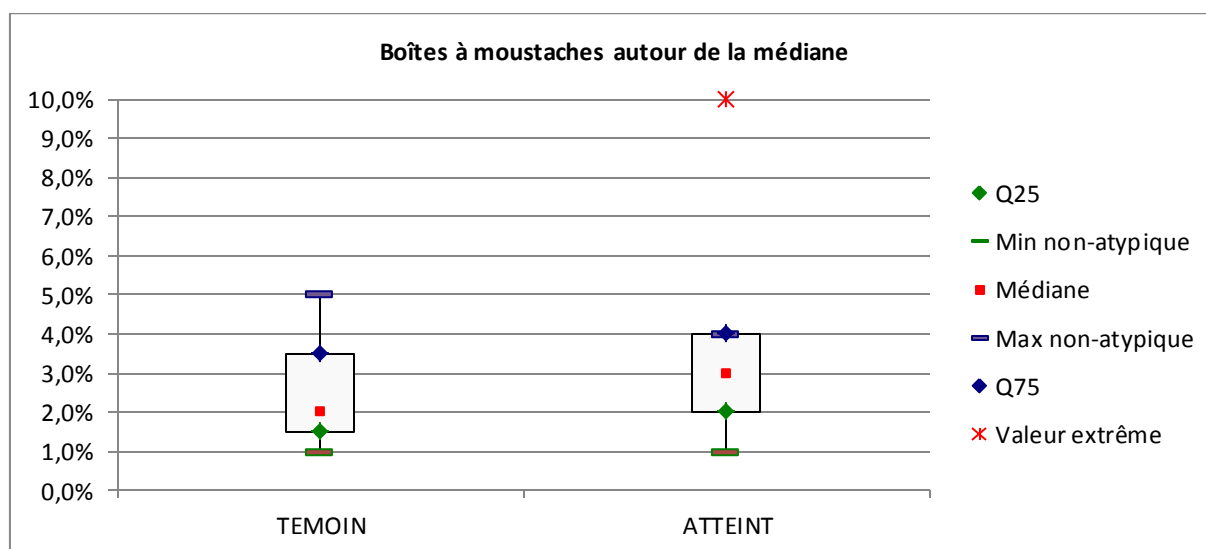
<i>Densité maximale de juments suivées dans les herbages</i>	<i>Moins de 2/ha</i>	<i>Strictement plus de 2/ha</i>	<i>Total</i>
TEMOIN (n=3)	33%	67%	100%
ATTEINT (n=6)	67%	33%	100%

Dans deux haras témoins sur les trois visités, la densité dépasse 2 juments suivées par hectare, alors que dans 4 haras atteints sur les six visités, la densité dans les champs est inférieure ou égale à 2 juments suivées par hectare. Il n'y a pas de différence significative entre les élevages des deux lots (test exact de Fisher, $p=0,4$).

En revanche, en 2005, lors de l'enquête à large échelle, la présence de plus de deux juments suivées dans les champs était statistiquement associée à la présence de cas de rhodococcose dans l'élevage (OR = 3,17 [1,24 – 8,09]).

De la même manière que dans le paddock, les enquêteurs ont évalué le jour de leur visite la proportion de zones en terre dans le champ.

Figure 28 : Proportion d'aires sans herbe dans les champs des haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



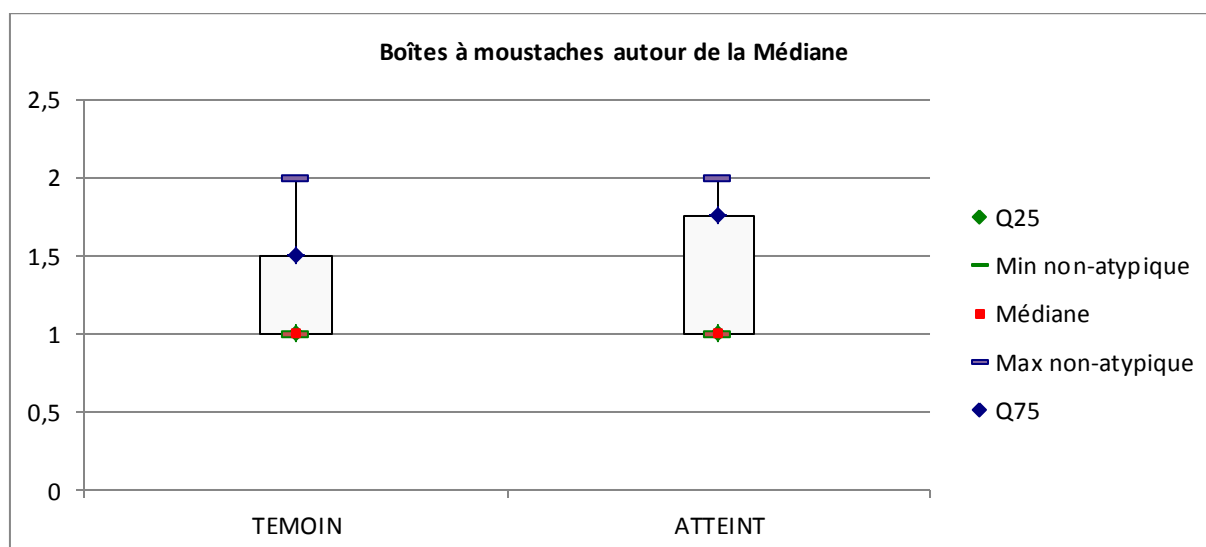
La médiane de la proportion d'aires en terre est 2 % dans les haras témoins et 3 % dans les haras atteints ; il y a une valeur atypique dans le lot des haras atteints : il y a 10 % d'aires sans herbe dans le champ du haras H1. Dans le haras atteint R0-H9, la proportion d'aires sans herbe était de 3 % lors de notre première visite (31 Mai 2012) et 2 % lors de notre seconde visite (10 août 2012). Dans le haras H4, il n'y a pas de zone sans herbe dans le champ, il y a 7 % d'aires sans herbe dans le champ du haras H7. Le nombre de haras visités est trop faible pour réaliser un test de Wilcoxon, il ne semble pas y avoir de différence entre les haras témoins et les haras atteints de notre échantillon.

Les enquêteurs ont noté le nombre d'aires sans herbe dans les champs dans lesquels nous avons réalisé nos prélèvements. Lors de notre visite l'ensemble des haras présentait plus d'une aire sans herbe dans les champs que nous avons étudiés (seuil mis en évidence lors de l'enquête à large échelle réalisée en 2005 en Basse-Normandie (TAPPREST *et al.*, 2012)). Si nous prenons comme seuil entre 0 et 2 aires sans herbe et entre 3 et 5, alors dans les élevages que nous avons visités, il y a un tiers des élevages sains et un tiers des élevages atteints qui ont entre 0 et 2 aires sans herbe dans le champ. Il n'y a donc pas de différence entre les haras témoins et atteints de notre échantillon (test exact de Fisher, $p=0,77$).

Dans l'enquête réalisée en 2005, la présence de 2 ou plus d'aires sans herbe dans le champ était statistiquement associée à la présence de cas de rhodococcose dans les élevages (OR = 3,33 [1,30 – 8,35]).

Nous étudions l'exposition des poulains aux poussières dans le champ le jour de notre visite, pour cela, les enquêteurs ont noté la quantité de poussières en suspension dans l'air en appliquant la même notation que celle utilisée pour les paddocks, la note 1 correspond à l'absence de poussières visibles à l'œil nu, la note maximale est de 5.

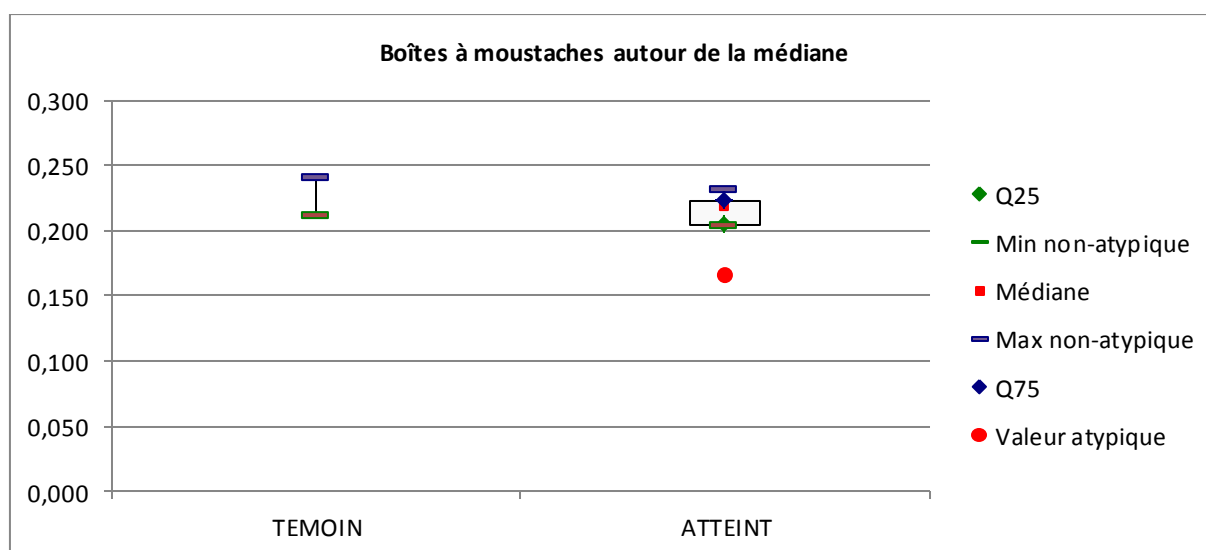
Figure 29 : Note de poussière dans le champ des haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



Dans les haras témoins et atteints, la médiane de la note de poussière dans le champ est de 1, soit une absence de poussières en suspension dans l'air visibles à l'œil nu. Dans le haras R0-H9, la note de poussière dans le champ était de 1/5 lors de notre première visite (31 Mai 2012) et de 2/5 lors de notre seconde visite (10 Août 2012). Dans les élevages sporadiques H4 et H7, la note de poussière dans les champs est de 1. Il ne semble pas y avoir de différence significative entre haras témoins et atteints.

Nous étudions l'humidité de la terre prélevée dans le champ le jour de notre visite, au centre du champ entre la surface et 5 cm de profondeur.

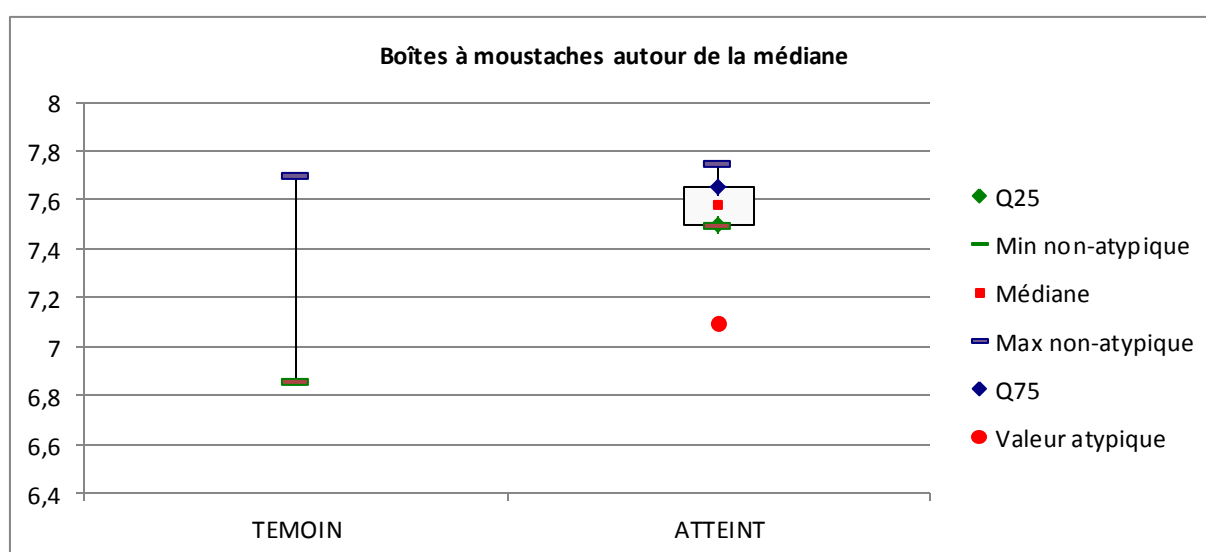
Figure 30 : Humidité de la terre dans le champ pour les haras témoins (n=2) et les haras atteints (n=5). Le lot des haras témoins ne comprenant que 2 haras pour cette mesure, le maximum non atypique correspond au haras H5 et le minimum non atypique au haras H6.



La mesure n'a pas été réalisée dans les haras T0 et H1 ainsi que lors de notre première visite dans le haras R0-H9. Dans les haras témoins, l'humidité de la terre dans le champ est de 21,15 % dans le haras H6 et 24,10 % dans le haras H5. Dans les haras atteints, la médiane de l'humidité est de 21,80 % ; le haras H2 représente une valeur atypique avec une humidité de la terre de 17 %. Parmi les haras sporadiques, l'humidité relevée dans la terre du champ est de 30,50 % dans le haras H4 et 20,50 % dans le haras H7. Le nombre de haras étudiés est trop faible pour réaliser un test statistique.

Nous étudions maintenant le pH dans la terre du champ, sur un échantillon prélevé entre la surface et 5 cm de profondeur au centre du champ.

Figure 31 : pH de la terre des champs dans les haras témoins (n=2) et atteints (n=5). Le lot des haras témoins ne comprenant que 2 haras pour cette mesure, le maximum non atypique correspond au haras H6 et le minimum non atypique au haras H5.



La mesure n'a pas été réalisée dans les haras T0 et H1 ainsi que lors de notre première visite dans le haras R0-H9. Dans les haras témoins, le pH de la terre du paddock est de 6,86 dans le haras H5 et de 7,7 dans le haras H6. Dans les haras atteints, la médiane du pH est de 7,58, le haras H2 représente une valeur atypique avec un pH de 7,1. Parmi les haras sporadiques, le pH relevé dans la terre du champ est de 6,99 dans le haras H4 et 7,7 dans le haras H7. Le nombre de haras est trop faible pour réaliser un test statistique.

4.3. Isolement de *Rhodococcus equi* dans les élevages visités

4.3.1. Estimation de la survie de *Rhodococcus equi* dans notre protocole de prélèvement avec le CIP10 M

Avant de présenter nos résultats d'isolement de *Rhodococcus equi* dans les élevages que nous avons visités, nous allons exposer les résultats de la manipulation réalisée *a posteriori* au laboratoire afin d'étudier la survie de *R. equi* après nos prélèvements à l'aide du CIP10 M.

L'étude de survie de *Rhodococcus equi* après prélèvement à l'aide du CIP10 M a été réalisée deux fois. La première fois, nous avons testé trois durées de rotation (0, 90 et 180 minutes) en mettant dans chaque coupelle le volume de bouillon de culture censé contenir 50 bactéries.

Au vu des résultats de cette première manipulation, nous avons décidé de réutiliser le même protocole en diminuant les temps de rotation des appareils. La seconde fois, dans les mêmes conditions d'environnement (étuve ouverte à 25°C), nous avons donc testé deux autres durées de rotation (0, 30 et 60 minutes) en mettant 150 bactéries dans chaque coupelle au départ. Pour chaque manipulation, le témoin de 0 minutes correspond à une coupelle contenant le même nombre de bactéries que les autres de l'essai, montée sur un CIP qui n'est pas mis en marche. Le volume dans la coupelle est récolté après l'extinction du dernier appareil en marche.

Tableau 20 : Récapitulatif des essais menés au laboratoire pour tester la survie de *Rhodococcus equi* dans les conditions de prélèvement d'air.

		N° essai	Temps de fonctionnement du CIP			N° essai	Temps de fonctionnement du CIP
Manipulation 1	Essai n°1		0 min	Manipulation 2	Essai n°A		0 min
			90 min				30 min
			180 min				60 min
	Essai n°2		0 min		Essai n°B		0 min
			90 min				30 min
			180 min				60 min
	Essai n°3		0 min		Essai n°C		0 min
			90 min				30 min
			180 min				60 min

4.3.1.1. Influence de la rotation de la coupelle sur l'évaporation du BHI qu'elle contient.

Nous avons observé dans l'étude réalisée en 2012, que le volume de BHI récolté après 90 minutes d'échantillonnage est inférieur à celui inséré dans la coupelle au départ. Nos hypothèses

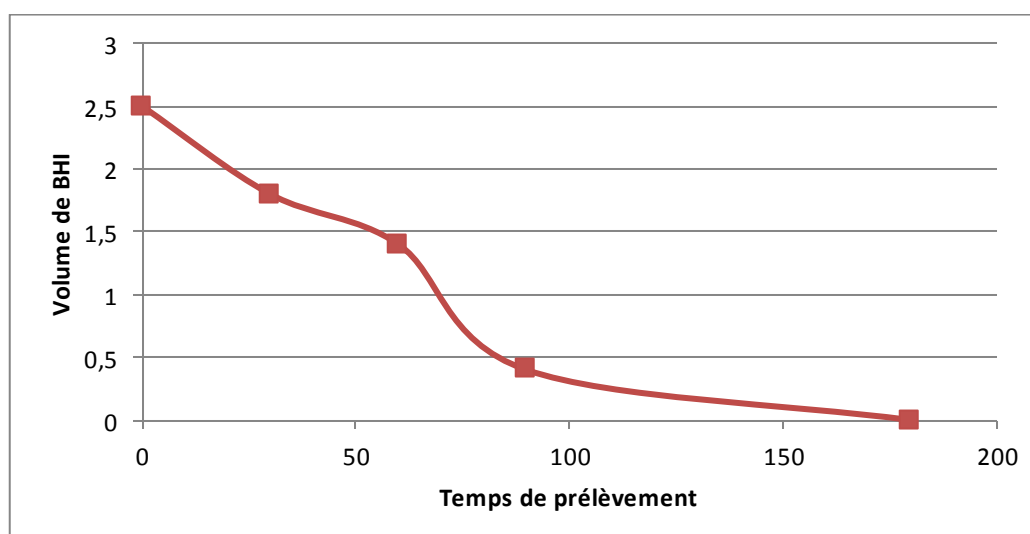
sont que l'exposition du liquide à l'air ambiant entraîne une évaporation de l'eau contenue dans le BHI et que le flux d'air passant dans la coupelle lors de la rotation de celle-ci augmente l'évaporation du BHI. Par ailleurs, l'évaporation du BHI pourrait avoir un effet direct sur la survie des bactéries récoltées : l'évaporation de la partie aqueuse de la solution entraîne une concentration des nutriments qu'elle contient et donc une augmentation de la pression osmotique qui pourrait conduire à une déshydratation des bactéries.

Tableau 21 : Volume moyen de BHI (en mL) récupéré. Dans chaque manipulation, le volume à 0 minutes correspond au volume restant dans la coupelle du CIP non allumé (témoin) récupéré après l'extinction du dernier appareil de la manipulation en cours.

Volume moyen de BHI récupéré		
Manipulation 1	Témoin	2,1
	90 min	0,4
	180 min	0
Manipulation 2	Témoin	2,1
	30 min	1,8
	60 min	1,4

Dans chaque coupelle, nous avons mis 2,5 mL de liquide (bouillon contenant les bactéries complété à 2,5 mL avec du BHI stérile). Nous remarquons que dans chaque coupelle témoin, il reste 2,1 mL de BHI après respectivement 180 et 60 minutes d'exposition à l'air de l'étuve (+25°C), sans rotation du CIP. L'exposition à l'air ambiant joue donc un rôle dans l'évaporation du BHI. Cependant ce rôle semble limité, car dans nos conditions expérimentales, la quantité de BHI évaporé est la même après 180 minutes (manipulation 1) et 60 minutes (manipulation 2). Nous allons maintenant étudier l'influence de la rotation du CIP sur l'évaporation du BHI.

Figure 32 : Volume moyen de BHI récolté en fonction du temps de rotation du CIP10 M en atmosphère contrôlée. Par défaut la valeur à 0 minute correspond au volume de BHI introduit dans les coupelles en début de manipulation. Toutes les coupelles ayant tourné 180 minutes ont été constatées vides à la fin de la manipulation.



Toutes les coupelles pour une même durée de rotation contenaient le même volume de BHI en fin de manipulation, sauf à 90 minutes de rotation où les coupelles comprenaient respectivement 0,3, 0,5 et 0,4 mL. Pendant les 60 premières minutes de fonctionnement, la vitesse d'évaporation du BHI semble suivre une régression linéaire. En revanche entre 60 minutes (temps maximum de rotation dans la manipulation 1) et 90 minutes de rotation (temps minimum de rotation dans la manipulation 2), l'évaporation du liquide augmente. Nous ne savons pas expliquer ceci mais il est peu probable que ce soit lié à une différence d'environnement entre les manipulations 1 et 2, car les coupelles témoins se sont comportées de la même manière entre ces deux manipulations.

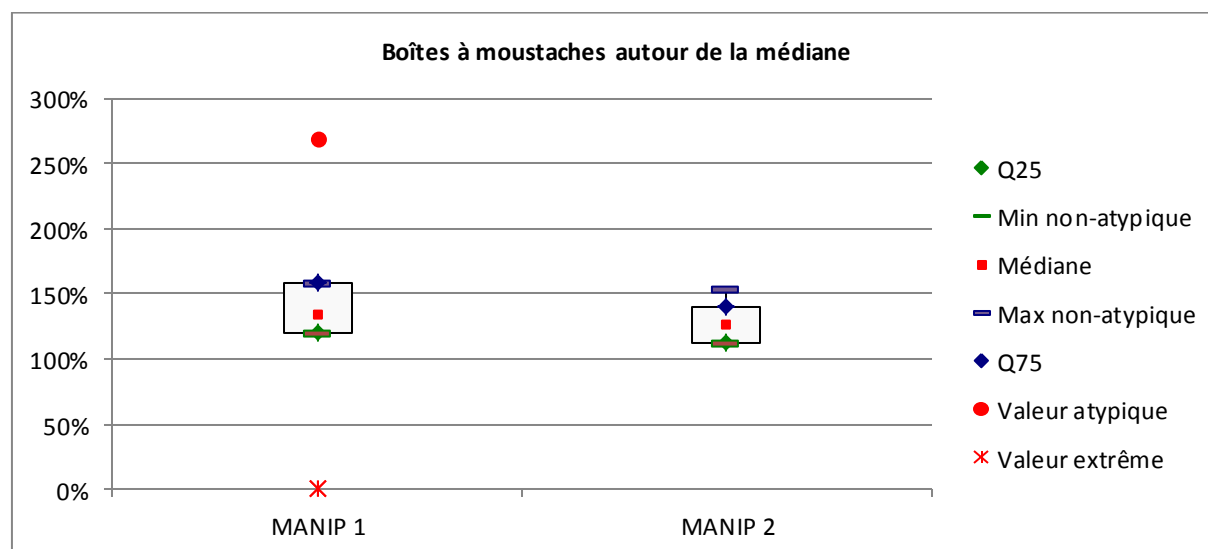
Après 180 minutes de prélèvement, toutes les coupelles ont été récupérées vides. Au vu du montage du CIP (carter opaque au-dessus des coupelles), il ne nous était pas possible de noter à quel moment le liquide a fini de s'évaporer dans chaque coupelle.

4.3.1.2. Influence du temps de prélèvement sur la survie de *Rhodococcus equi* virulent.

Dans la plupart des coupelles témoins, le nombre de bactéries comptées après la mise en culture est supérieur au nombre de bactéries initialement introduites dans la coupelle. Lors de la manipulation 1, sur les 9 géloses ensemencées avec le liquide issu des coupelles témoins, il y en a deux sur lesquelles aucune colonie de *Rhodococcus equi* n'a été retrouvée (une dans l'essai 2 et une dans l'essai 3).

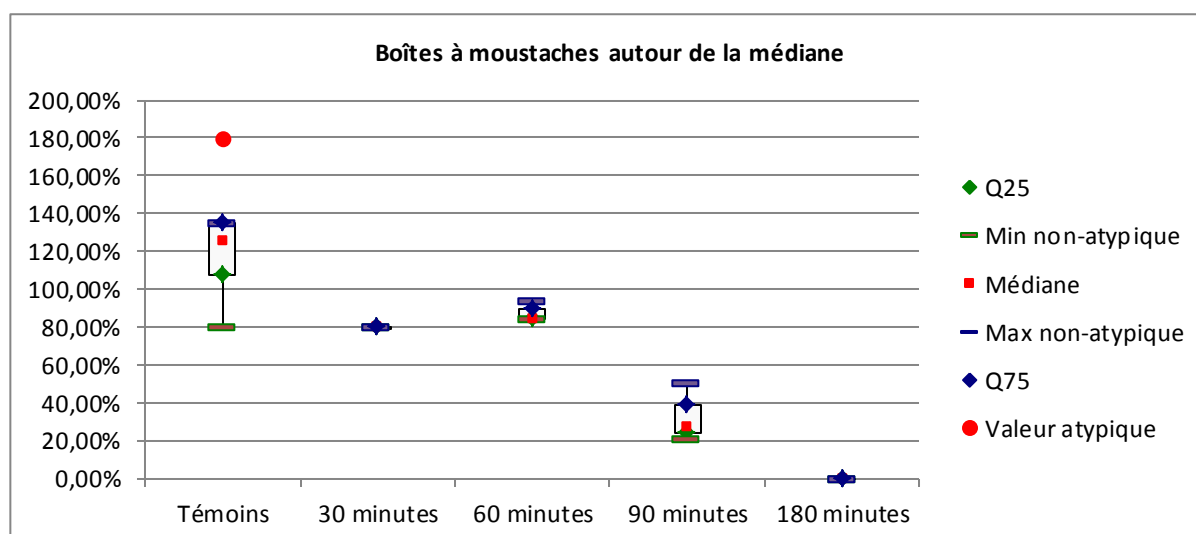
Dans la manipulation 1, il y a en moyenne 21% de *Rhodococcus equi* en plus dans les boîtes de culture par rapport au nombre de bactéries initialement introduites dans la coupelle et 29 % de *R. equi* en plus dans la manipulation 2. Il n'y a pas de différence significative dans le nombre de *R. equi* par coupelle entre ces deux manipulations (test de Mann-Whitney, $p=0,86$).

Figure 33 : Survie de *Rhodococcus equi* dans les coupelles témoin lors de la manipulation 1 et de la manipulation 2.



Nous allons maintenant étudier le pourcentage de survie des *Rhodococcus equi* mis dans les coupelles en fonction du temps de rotation de la coupelle.

Figure 34 : Survie de *Rhodococcus equi* en fonction du temps de rotation du CIP10 M en conditions expérimentales.



Le taux de survie est calculé en comparant le nombre de bactéries viables dans chaque coupelle après la rotation (rapport entre le nombre de bactéries sur les géloses, le volume de BHI ayant servi àensemencer les coupelles et le volume de BHI présent dans la coupelle) et en le rapportant au nombre de bactéries initialement introduites dans chaque coupelle.

Nous retrouvons la multiplication des bactéries dans les coupelles témoins. A 30 et à 60 minutes de rotation, le taux de survie médian de *Rhodococcus equi* est respectivement de 80 % et 84 %. A 90 minutes, nous observons une forte chute du taux de survie médian de *Rhodococcus equi* (27%). Le nombre d'essais effectués est insuffisant pour réaliser un test statistique de Mann-Whitney, en revanche il semblerait qu'il y ait une forte chute du taux de survie entre 60 et 90 minutes dans notre modèle expérimental. A 180 minutes, n'ayant plus de liquide dans les coupelles, nous n'avons pas pu déterminer de taux de survie.

4.3.1.2.1. Conservation du plasmide de virulence

Nous avons mis dans les coupelles uniquement des souches de *R. equi* possédant le plasmide de virulence. Toutes les souches de *Rhodococcus equi* isolées en culture après les manipulations ont été testées par PCR et comprenaient le plasmide de virulence aussi. Notre mode de collecte n'entraîne donc pas de perte du plasmide de virulence.

Nous allons maintenant étudier les résultats de la recherche de *Rhodococcus equi* dans l'air et dans le sol. La quantité d'aérosols récoltés avec le CIP 10M dans l'air à un moment donné peut varier en fonction des conditions climatiques au moment du prélèvement (hygrométrie ambiante, température, vent) et du fonctionnement de l'appareil (vitesse de rotation, usure du moteur), sur chacune des surfaces que nous avons étudiées (boxes, paddock, champ). Nous commencerons donc par étudier ces différents paramètres avant de présenter les résultats bactériologiques. Nous rappelons que les moteurs des CIP ont été choisis par tirage au sort pour chaque prélèvement.

Dans l'ensemble des graphiques de cette partie, nous n'utilisons que les valeurs de notre seconde visite dans le haras R0 – H9. Lors de notre première visite, la jument sur laquelle était fixé l'appareil dans le paddock a mal supporté le bruit du moteur et nous avons arrêté le prélèvement prématurément, nos mesures sont donc incomplètes pour cette visite.

4.3.2. Isolement de *Rhodococcus equi* dans le box

Nous commençons par étudier la présence de la bactérie dans les box où sont hébergés les poulains dès leurs premiers jours de vie. Pour chaque élevage, nous avons effectué nos prélèvements dans un box en présence d'une poulinière suitée.

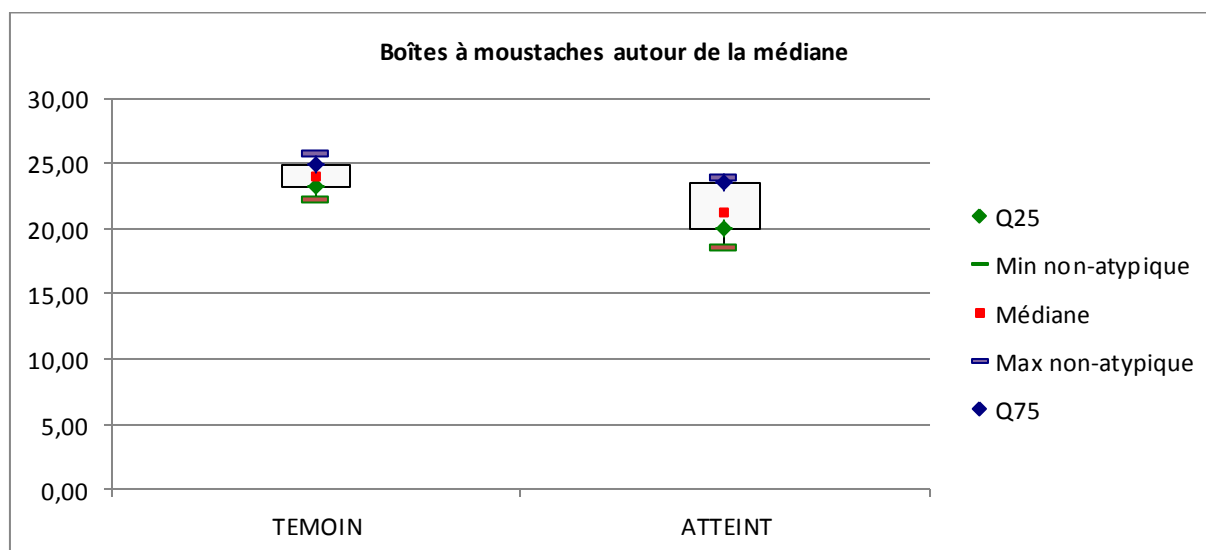
Dans le haras H10 au jour de notre visite, aucune poulinière suitée n'était présente dans les box, d'où l'absence de mesures pour cet élevage.

4.3.2.1. Isolement de *Rhodococcus equi* dans l'air du box

Le prélèvement d'air dans le box était réalisé par deux appareils situés sur la litière, le long d'un mur, l'un proche de l'entrée du box, le second diamétralement opposé au premier.

Le prélèvement d'air dans les box a été commencé entre 09h50 et 10h40 dans les haras témoins, entre 10h00 et 10h43 dans les haras atteints. Dans les haras sporadiques, le prélèvement d'air a commencé dans le box à 10h40 dans le haras H4 et 10h12 dans le haras H7. Tous les prélèvements ont duré 90 minutes. La vitesse du vent mesurée à l'entrée du box au début du prélèvement d'air était nul dans tous les haras visités, excepté dans le haras atteint H8 où il atteignait une vitesse de $0,8 \text{ m.s}^{-1}$. Nous étudions maintenant la température relevée dans le box pour les haras témoins et atteints.

Figure 35 : Température dans le box relevée au début du prélèvement d'air dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=5).

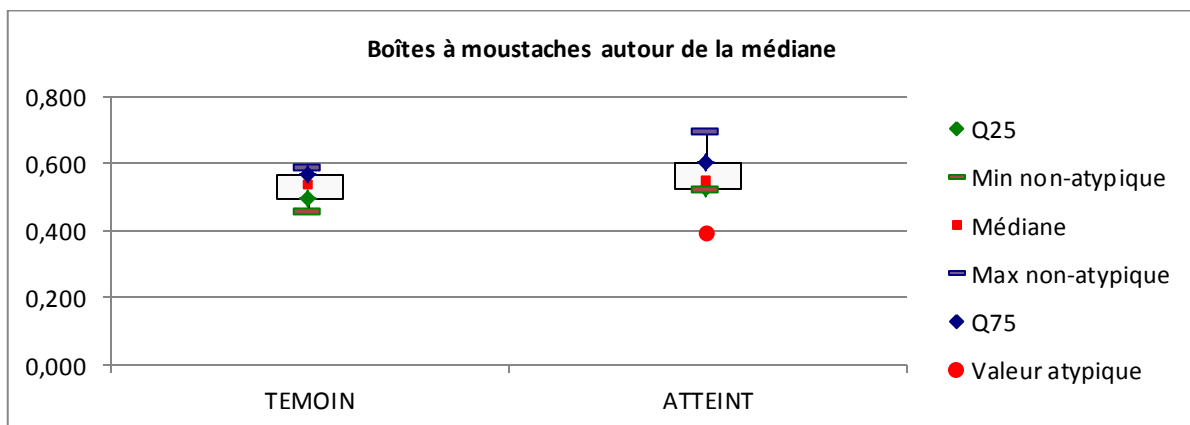


La médiane de température dans le box est de 24°C dans les haras témoins et 21,2°C dans les haras atteints. Les effectifs sont trop faibles pour permettre de réaliser un test statistique, cependant il semble que la température était légèrement plus élevée dans les box des haras témoins de notre

échantillon. Dans les haras sporadiques, la température dans le box était de 22,1°C dans le haras H4 et 23°C dans le haras H7. Nous étudions maintenant l'humidité relevée dans le box pour les haras témoins et atteints.

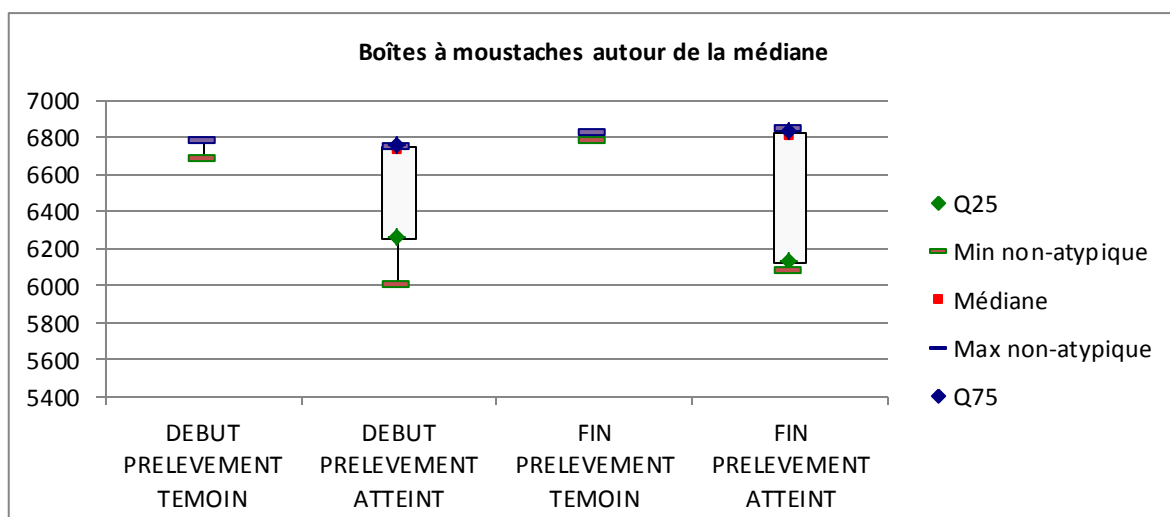
La médiane de l'humidité de l'air dans le box dans les haras témoins est de 53,5%, et 55,0% dans les haras atteints, le haras H8 représente une valeur atypique avec une humidité de 39,0%. Il ne semble pas y avoir de différence d'humidité dans l'air du box entre les haras témoins et atteints. Dans les haras sporadiques, l'humidité était de 53,6 % dans le haras H4 et 71,2 % dans le haras H7.

Figure 36 : Humidité de l'air relevée à l'entrée du box au début du prélèvement d'air dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=5).



Nous étudions maintenant le fonctionnement des CIP 10M à l'aide des vitesses de rotation mesurées au début et à la fin de chaque prélèvement, en commençant par les appareils placés proches de l'entrée du box. La mesure de vitesse de rotation n'a pas été effectuée pour des raisons techniques dans le haras témoin H5.

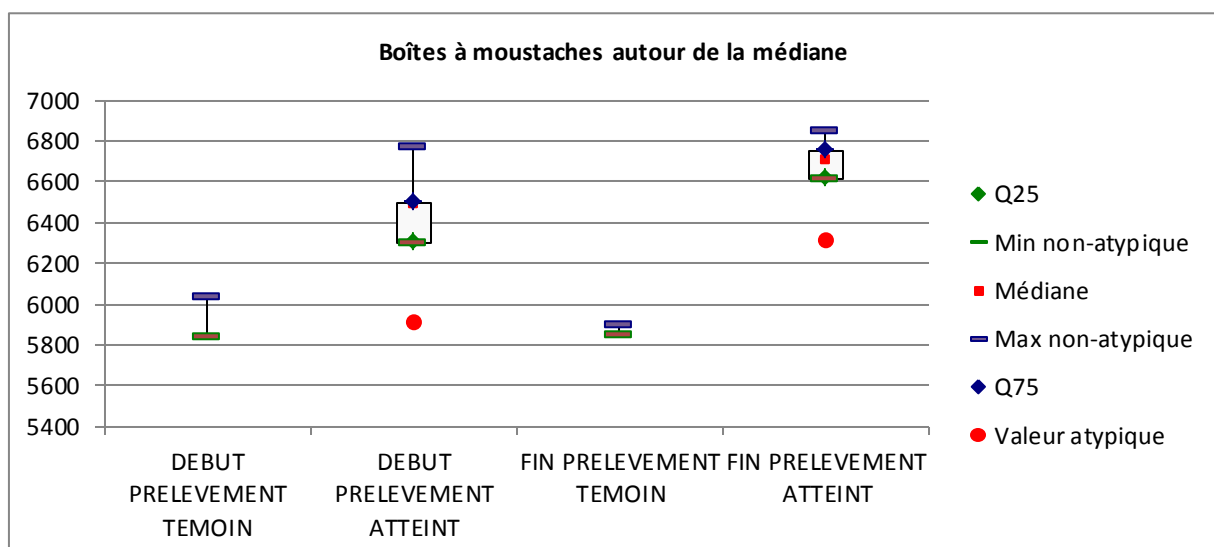
Figure 37 : Vitesse de rotation de la coupelle des CIP 10M placés à l'entrée du box dans les haras sains (n=2) et atteints (n=5), au début et à la fin du prélèvement. Ne disposant pas de mesure pour le haras H5, la médiane n'a pas été calculée pour les haras sains.



Dans les haras sains et les haras atteints, il n'y a pas de différence de vitesse de rotation entre le début et la fin du prélèvement. La médiane de vitesse de rotation est de 6 730 tr/min en début de prélèvement et 6 800 tr/min en fin de prélèvement dans les haras atteints, ce qui est proche des valeurs mesurées pour les haras sains. En revanche, lors du prélèvement dans les haras atteints H3 et H8, à l'entrée du box, la vitesse de rotation était plus faible que lors des prélèvements dans les autres haras (vitesse en début de prélèvement 6 246 tr/min dans le haras H3 et 6 007 tr/min dans le haras H8) ; pour ces deux haras, le CIP à l'entrée du box était le CIP n°3. Dans les haras sporadiques, la vitesse de rotation en début de prélèvement était de 6 755 tr/min dans le haras H4 et 6 773 tr/min dans le haras H7.

Nous étudions maintenant la vitesse de rotation des CIP disposés au fond du box.

Figure 38 : Vitesse de rotation de la coupelle des CIP 10M placés au fond du box dans les haras sains (n=2) et atteints (n=5), au début et à la fin du prélèvement. Ne disposant pas de mesure pour le haras H5, la médiane n'a pas été calculée pour les haras sains.



Dans les haras sains, Il n'y a pas de différence dans la vitesse de rotation entre le début du prélèvement et la fin du prélèvement, en revanche, les vitesses de rotations sont globalement 900 tr/min inférieures aux médianes de vitesse de rotation des appareils disposés à l'entrée du box. Dans les haras atteints, la médiane de la vitesse de rotation est de 6 488 tr/min en début de prélèvement (la valeur atypique correspond au haras H3, CIP n°1), en fin de prélèvement la médiane est de 6 705tr/min (la valeur atypique correspond au haras H1, CIP n°2). Le nombre de haras visités ne nous permet pas de réaliser un test statistique.

Nous retenons que les conditions de prélèvement sont semblables entre les haras du lot témoin et ceux du lot atteint, en notant que la température semble légèrement plus élevée dans les box des élevages témoins. Nous remarquons des disparités concernant la vitesse de rotation des CIP 10M, bien qu'il ne semble pas que l'un des trois moteurs utilisés soit particulièrement incriminé.

Aucune souche virulente de *Rhodococcus equi* n'a été isolée par le prélèvement d'air à l'entrée du box. *Rhodococcus equi* virulent a été isolé au fond du box dans le haras témoin H5 à la concentration de 12 UFC par m³ d'air.

Rhodococcus equi non virulent a été isolé à l'entrée et au fond du box dans le haras atteint H2 à la concentration de 4,3 UFC/m³ d'air.

4.3.2.2. Isolement de *Rhodococcus equi* sur le sol du box

Dans le box sélectionné pour chaque haras visité, nous appliquons une lingette imbibée d'eau peptonée sur le sol en ayant préalablement dégagé la litière. Aucune souche de *Rhodococcus equi* virulent ou non virulent n'a été cultivée à partir de ce prélèvement.

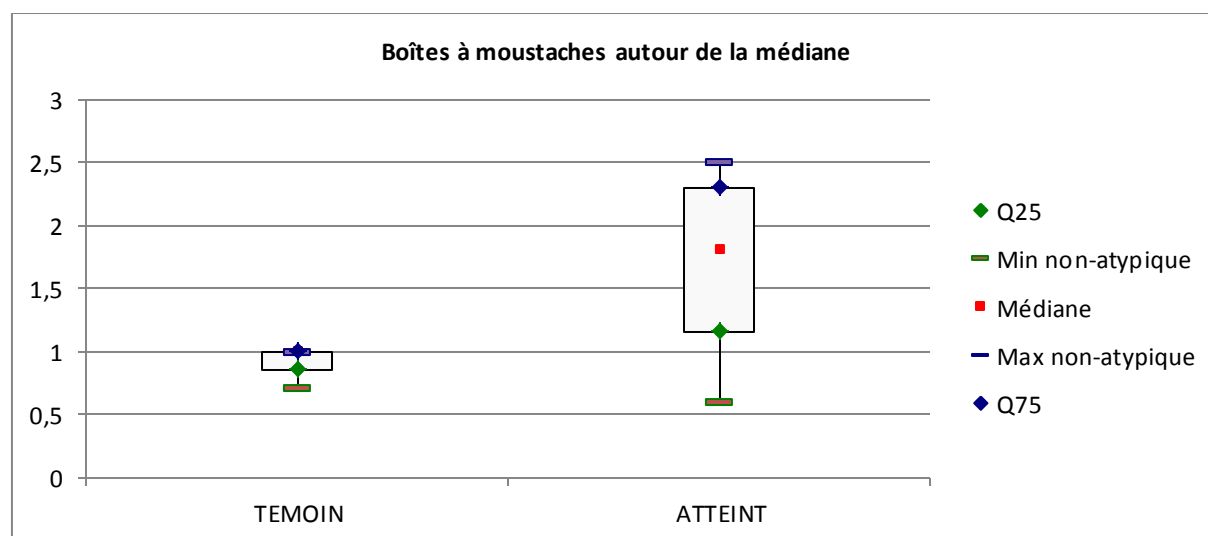
4.3.3. Isolement de *Rhodococcus equi* dans le paddock

Dans chaque élevage visité, nous avons choisi en accord avec l'éleveur un paddock sur lequel des poulinières suitées étaient régulièrement lâchées au moment de notre passage, le plus poussiéreux parmi les paddocks utilisés pour les poulains et sur lequel il y a déjà eu des cas de rhodococcose le cas échéant.

4.3.3.1. Isolement de *Rhodococcus equi* dans l'air du paddock

Dans les haras témoins, le début des prélèvements d'air est étalé entre 09h35 et 11h50 ; dans les haras atteints les prélèvements ont commencé entre 09h45 et 11h50. Dans le haras sporadique H4 le prélèvement d'air a commencé à 10h30 sur le paddock, dans le haras H7, le prélèvement d'air a commencé à 12h12. Tous les prélèvements d'air sur le paddock ont duré 90 minutes, sauf dans le haras H3 où nous avons eu des difficultés à approcher la jument qui portait le CIP 10M, le prélèvement a duré 110 minutes. Nous étudions maintenant la vitesse du vent mesurée dans chaque paddock au début du prélèvement d'air.

Figure 39 : Vitesse du vent mesurée en m/s dans les paddocks dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6).



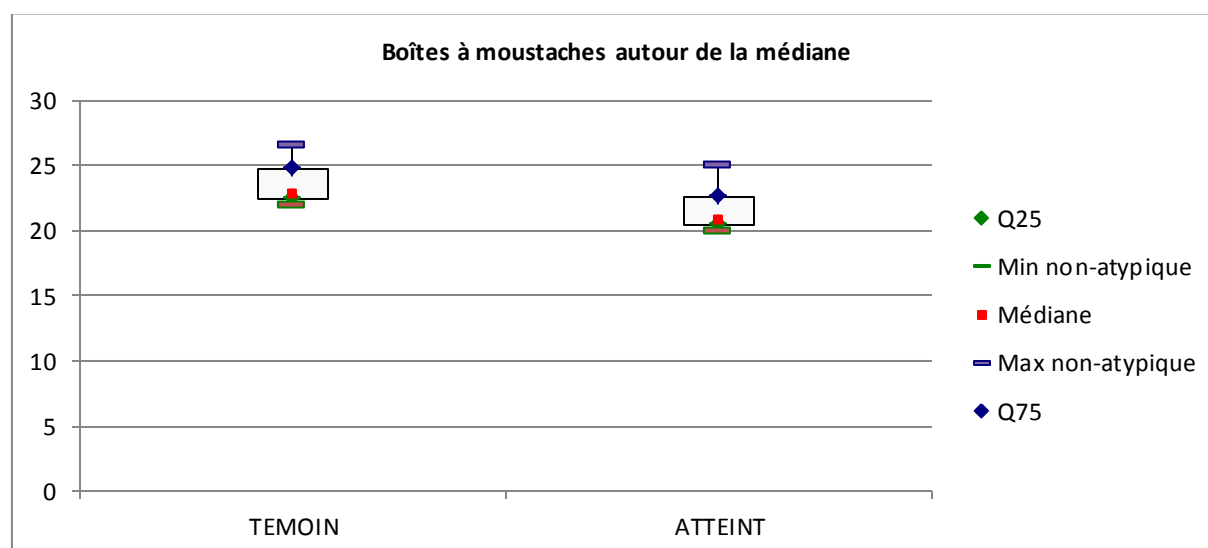
La médiane de vitesse du vent dans les haras témoins est de 1m.s^{-1} , elle est de $1,8\text{m.s}^{-1}$ dans les haras atteints. La vitesse du vent mesurée dans le paddock du haras H4 était de $1,2\text{m.s}^{-1}$, dans le haras H7 elle était de $0,5\text{m.s}^{-1}$.

Tableau 22 : Vitesse du vent mesurés dans le paddock des haras témoins (n=3) et atteints (n=6) par rapport au seuil de 1m.s^{-1} .

Vitesse du vent dans le paddock	$\leq 1\text{m.s}^{-1}$	$> 1\text{m.s}^{-1}$	Total
TEMOIN (n=3)	100%	0%	100%
ATTEINT (n=6)	17%	83%	100%

Nous étudions maintenant la température relevée dans le paddock en début de prélèvement d'air, au point le plus ensoleillé du paddock.

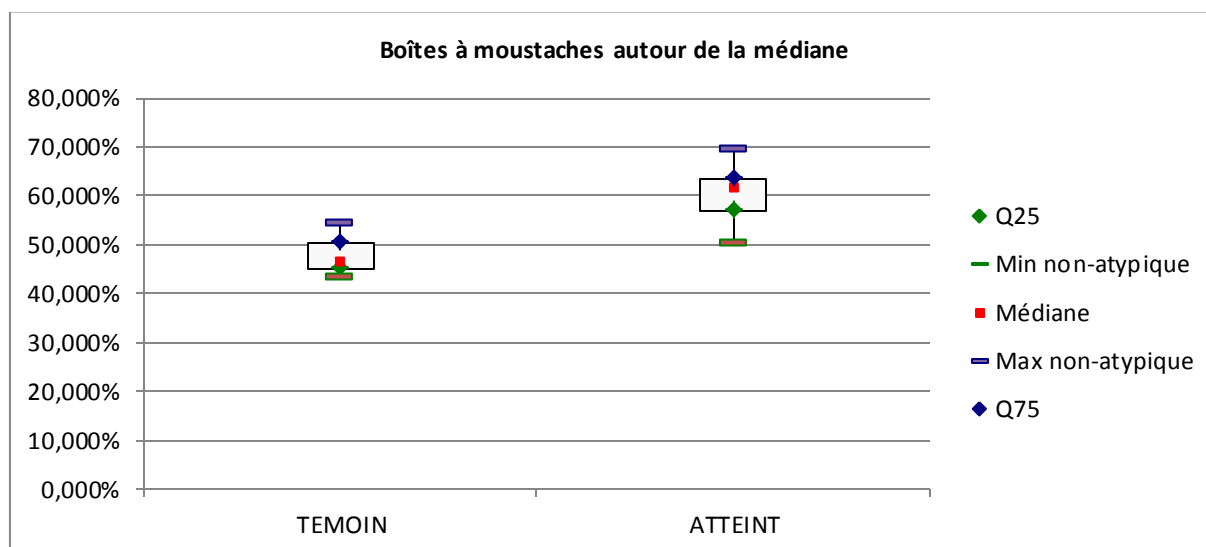
Figure 40 : Température relevée dans le paddock dans les haras témoins (n=3° et atteints (n=6).



La médiane de température ambiante dans le paddock est de $22,8^{\circ}\text{C}$ dans les haras témoins et $20,8^{\circ}\text{C}$ dans les haras atteints. Il ne semble pas y avoir de différence entre les haras témoins et atteints. Dans les haras sporadiques, la température relevée est de $20,3^{\circ}\text{C}$ dans les haras H4 et $28,1^{\circ}\text{C}$ dans le haras H7.

Nous étudions maintenant l'humidité de l'air dans les paddocks des élevages visités.

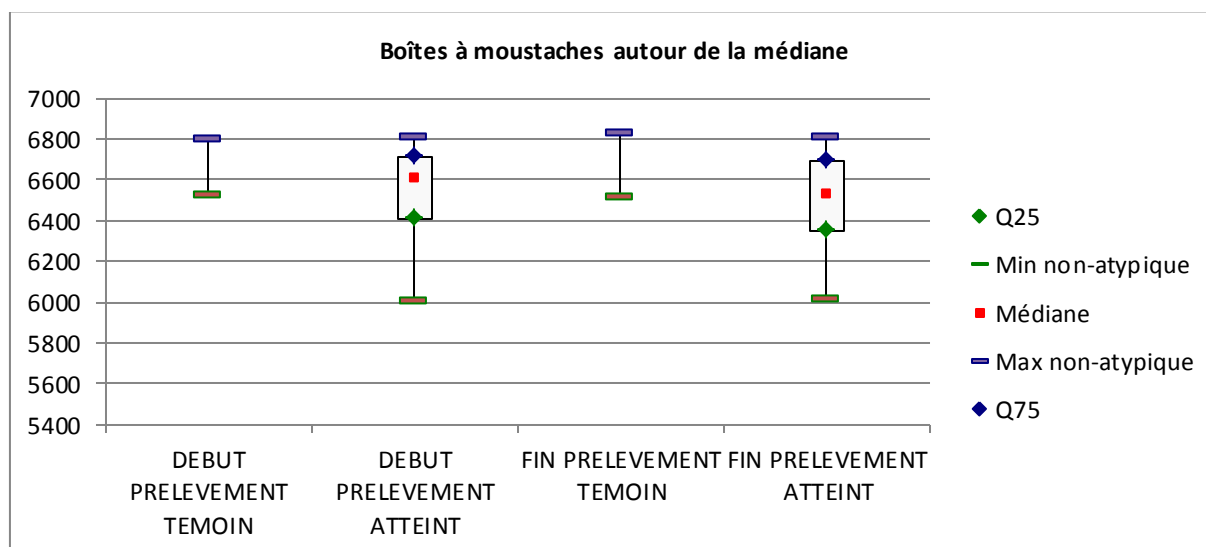
Figure 41 : Humidité de l'air mesurée dans les paddocks des haras témoins (n=3) et atteints (n=6) au début du prélèvement d'air.



La médiane de l'humidité dans les paddocks des élevages témoins est de 46,4 % contre 61,5 % dans les haras atteints. Dans les six haras atteints que nous avons visités, l'humidité relevée dans l'air était supérieure à 50,0 % ; parmi les haras témoins, l'humidité relevée était inférieure à 50,0 % dans deux des trois haras visités. Il n'y a pas de différence significative entre les deux lots (test exact de Fisher, $p=0,083$). Dans les haras sporadiques, nous avons relevé une humidité ambiante de 54,3 % dans le haras H4 et de 52,6 % dans le haras H7.

Nous allons maintenant vérifier le fonctionnement des appareils de prélèvement d'air en comparant les vitesses de rotation mesurées pour chaque prélèvement au début et à la fin. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas mesuré la vitesse de rotation dans le haras témoin H5.

Figure 42 : Vitesse de rotation des coupelles des CIP 10M mesurées au début et à la fin du prélèvement d'air dans le paddock dans les haras témoins (n=2) et atteints (n=6).

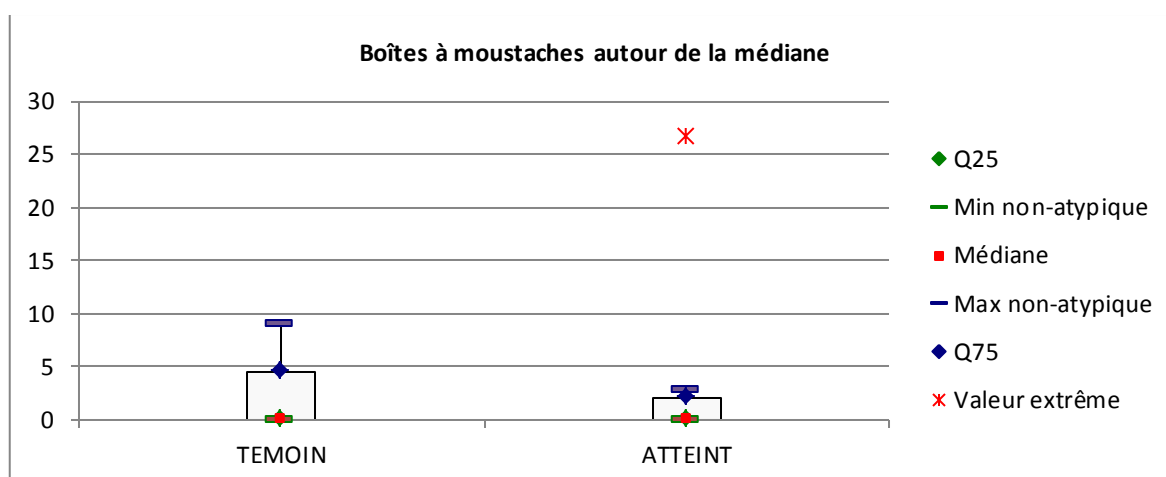


Les vitesses de rotation de la coupelle dans les haras sains et dans les haras atteints varient peu entre la mesure en début de prélèvement et la mesure à la fin du prélèvement. Par ailleurs, la vitesse de rotation médiane mesurée pour les haras atteints est comparable aux vitesses de rotation dans les haras témoins. Dans les haras atteints, nous avons mesuré une vitesse de rotation plus faible que les autres en début de prélèvement dans le haras H2 (6 004tr/min CIP n°3) et en fin de prélèvement dans le haras H1 (6 017tr/min CIP n°1). Dans les haras sporadiques, nous avons mesuré une vitesse de rotation en début de prélèvement de 6 436 tr/min dans le haras H4 (CIP n°2) et une vitesse de 6 356 tr/min dans le haras H7 (CIP n°2).

Nous retenons que les conditions de prélèvement d'air dans les paddocks sont semblables entre les haras du lot atteint et du lot témoin, tout en notant une vitesse de vent et une humidité ambiante légèrement inférieures dans les haras témoins.

Nous étudions la présence de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air prélevé dans le paddock.

Figure 43 : Concentration de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air sur le paddock étudié dans les haras du lot témoin (n=3) et atteint (n=6).



Dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6), la médiane de concentration de *Rhodococcus equi* virulent est de 0 UFC/m³ d'air. Parmi les haras témoins, nous avons récolté 9 UFC/m³ d'air de *Rhodococcus equi* virulent dans le haras H5, *Rhodococcus equi* virulent n'a pas été isolé dans l'air du paddock dans les haras T0 et H6. Parmi les haras atteints, nous avons récolté respectivement 2,86 et 26,6 UFC/m³ d'air de *Rhodococcus equi* virulent dans les haras R0 – H9 (visite du 10 Août 2012) et H10. *Rhodococcus equi* virulent a donc été isolé à la même fréquence dans l'air du paddock dans les haras témoins (1/3) et atteints (2/6).

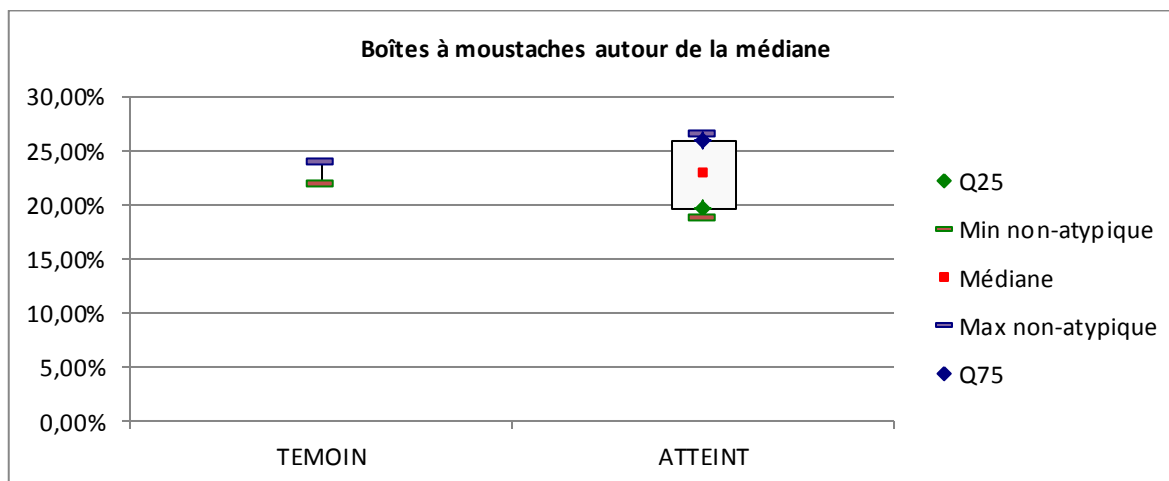
Aucune souche de *Rhodococcus equi* virulent n'a été prélevée dans le paddock du haras sporadique H4, 1 UFC/m³ d'air a été isolée dans le paddock du haras H7.

Rhodococcus equi non virulent a été isolé à la concentration de 6,1 UFC/m³ d'air dans le paddock du haras T0 et à la concentration de 2,3 UFC/m³ d'air dans le paddock haras H10.

4.3.3.2. Isolement de *Rhodococcus equi* dans le sol du paddock

Dans un premier temps, nous étudions l'humidité de la terre dans les paddocks.

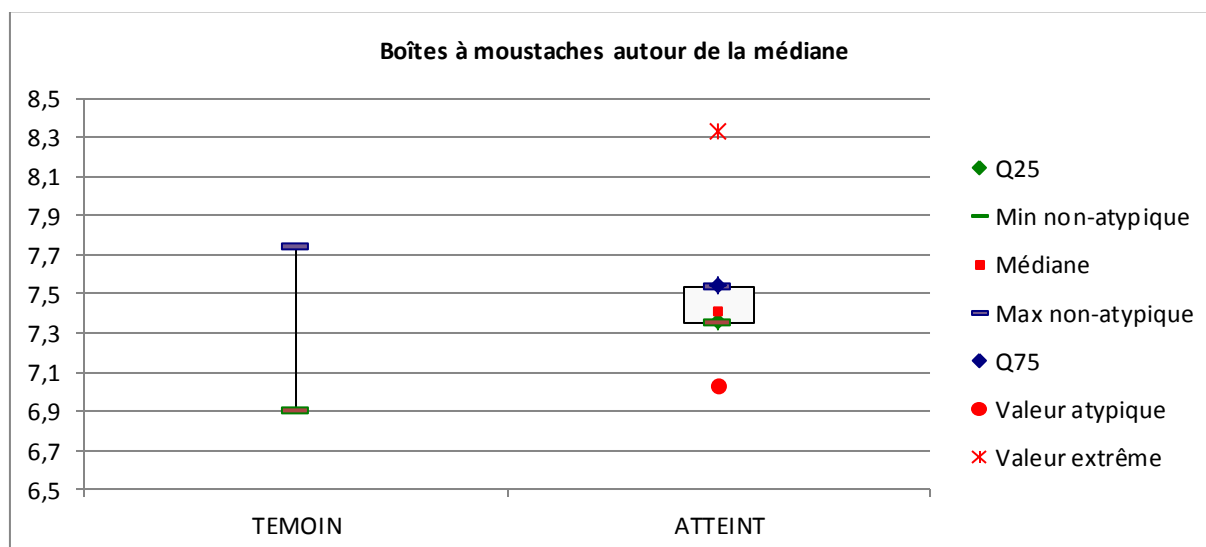
Figure 44 : Humidité du sol mesurée dans les paddocks des haras témoins (n=2) et atteints (n=5).



Nous ne disposons pas de valeur d'humidité du sol pour les haras T0, R0 et H1. Dans les haras témoins H5 et H6, l'humidité relevée dans le sol est respectivement 24,1 % et 22,0 %. La médiane de l'humidité dans le sol des haras atteints visités est de 22,9 %. Il ne semble pas y avoir de différence entre les haras témoins et atteints de notre échantillon quant à l'humidité du sol dans le paddock.

Nous étudions maintenant le pH du sol dans les paddocks des haras témoins et atteints de notre échantillon.

Figure 45 : pH du sol dans les paddocks des haras témoins (n=2) et atteints (n=5).



Nous ne disposons pas de valeur de pH du sol pour les haras T0, R0 et H1. Dans les haras témoins H5 et H6, le pH mesuré dans le sol du paddock est respectivement de 6,86 et de 7,7. Dans les haras atteints la médiane du pH est de 7,4. Il ne semble pas y avoir de différence entre les haras témoins et atteints de notre échantillon. Dans les haras sporadiques, nous avons mesuré un pH de 6,99 dans le haras H4 et de 7,7 dans le haras H7.

Nous étudions la présence de *Rhodococcus equi* virulent dans les paddocks des haras visités. *Rhodococcus equi* a été recherché dans des prélèvements de terre réalisés à l'entrée, au niveau de l'abreuvoir et au centre du paddock, à la surface et à 5 cm de profondeur.

Tableau 23 : Tableau de contingence isolement de *Rhodococcus equi* virulent dans le sol des paddocks dans les haras du lot témoin (n=3) et atteint (n=6). Nous considérons que *Rhodococcus equi* est présent sur le paddock s'il est retrouvé dans au moins un des six prélèvements de terre réalisés sur le paddock étudié.

<i>Rhodococcus equi</i> virulent isolé dans le sol du paddock	NON	OUI	Total
TEMOIN (n=3)	100%	0%	100%
ATTEINT (n=6)	17%	83%	100%

Rhodococcus equi virulent n'a pas été isolé dans le sol des paddocks des haras témoins, des souches virulentes ont été isolées dans les paddocks de cinq haras atteints parmi les six visités (R0 – H9, H2, H3, H8, H10). Il y a une différence significative entre les haras témoins et atteints (test exact de Fisher $p=0,048$). De la même manière que pour les prélèvements d'air, nous ne prenons en compte dans ce tableau que notre deuxième visite dans le haras R0 – H9 (le 10 Août 2012) ; lors de notre première visite aucune souche virulente n'a été retrouvée dans le paddock ; au mois d'Août, dans le même paddock, nous avons isolé *Rhodococcus equi* virulent dans le prélèvement de terre au centre du paddock à 5 cm de profondeur. *Rhodococcus equi* virulent a été isolé dans la terre autour de l'abreuvoir à 5 cm de profondeur dans le haras sporadique H4, nous n'avons pas isolé de souche virulente dans le haras H7.

Rhodococcus equi virulent n'a pas été retrouvé dans plus d'un prélèvement dans aucun des paddocks étudiés. Parmi les 6 prélèvements positifs pour *Rhodococcus equi* virulent, 1 correspond à un prélèvement à la surface, 5 correspondent à un prélèvement en profondeur ; *Rhodococcus equi* virulent est significativement plus isolé à 5 cm de profondeur qu'à la surface dans le paddock (test exact de Fisher, $p=0,04$).

Nous allons maintenant étudier la présence de *Rhodococcus equi* non virulent dans le sol des paddocks des haras visités.

Tableau 24 : Tableau de contingence isolement de *Rhodococcus equi* non virulent dans le sol des paddocks dans les haras du lot témoin (n=3) et atteint (n=6). Nous considérons que *Rhodococcus equi* est présent sur le paddock s'il est retrouvé dans au moins un des six prélèvements de terre réalisés sur le paddock étudié.

<i>Rhodococcus equi</i> non virulent isolé dans le sol du paddock	NON	OUI	Total
TEMOIN (n=3)	67%	33%	100%
ATTEINT (n =6)	67%	33%	100%

Rhodococcus equi non virulent a été isolé dans un haras témoin sur les trois visités (T0) et deux haras atteints sur les six visités (H2 et H3). Lors de notre première visite, nous avons isolé de nombreuses colonies de *Rhodococcus equi* non virulent dans le sol du paddock dans le haras R0 – H9 (à l'entrée, au niveau de l'abreuvoir et au centre du paddock), mais aucune souche non virulente n'a été retrouvée lors de notre seconde visite (celle prise en compte pour les comparaisons entre le lot témoin et atteint). Comme pour les souches virulentes, nous avons retrouvé *Rhodococcus equi* non virulent à 5 cm de profondeur dans la terre autour de l'abreuvoir dans le haras sporadique H4, mais pas dans le sol du paddock dans le haras H7.

Parmi les treize prélèvements de terre réalisés dans les paddocks à partir desquels nous avons isolé *Rhodococcus equi* non virulent, 5 sont des prélèvements de surface, 8 sont des prélèvements à 5 cm de profondeur, il n'y a pas de différence significative entre la fréquence d'isolement de *Rhodococcus equi* non virulent en fonction de la profondeur (test exact de Fisher, $p=0,22$).

Parmi les 13 prélèvements de sol de paddock dans lesquels nous avons isolé *Rhodococcus equi* non virulent, tous ont été réalisés lors de nos 6 premières visites (soit 36 prélèvements de sol), entre le 30 Mai 2012 et le 29 Juin 2012 (comprenant la première visite dans le haras R0 – H9). Lors de nos six dernières journées de prélèvements du 23 juillet au 24 Août 2012 (comprenant notre deuxième visite dans le haras R0 – H9), nous n'avons pas isolé *Rhodococcus equi* non virulent dans la terre des paddocks (sur 36 prélèvements de sol au total). La différence dans la fréquence d'isolement de *Rhodococcus equi* dans le sol du paddock avant le 30 Juin 2012 et après le 1^{er} Juillet 2012 est statistiquement significative (test du Chi2 $p<0,0001$). Il semble donc que *Rhodococcus equi* non virulent soit plus présent dans le sol jusqu'au mois de Juin, puis présent en plus faibles quantités aux mois de Juillet et Août. Cette différence ne se retrouve pas pour *Rhodococcus equi* virulent isolé à la même fréquence sur ces deux périodes.

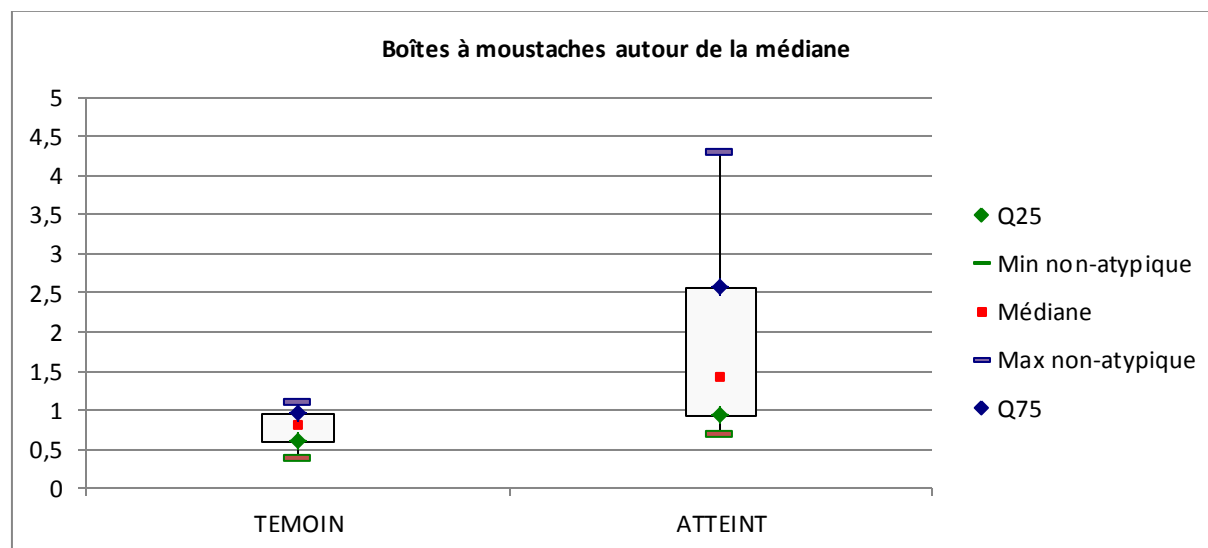
4.3.4. Isolement de *Rhodococcus equi* dans le champ

4.3.4.1. Isolement de *Rhodococcus equi* dans l'air du champ

Les prélèvements d'air ont commencé entre 09h55 et 12h15 dans les haras témoins, entre 09h49 et 12h49 dans les haras atteints ; dans les haras sporadiques, le prélèvement d'air dans le champ a commencé à 12h18 dans le haras H4 et à 10h00 dans les haras H7. Tous les prélèvements d'air dans les champs ont duré 90 minutes.

Nous étudions la vitesse du vent qui a été relevée au centre de chaque champ étudié au début du prélèvement d'air.

Figure 46 : Vitesse du vent mesurée dans les champs dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6), au début du prélèvement d'air.



La vitesse de vent médiane mesurée dans les haras témoins est de $0,8 \text{ m.s}^{-1}$, dans les haras atteints elle est de $1,4 \text{ m.s}^{-1}$. Dans les haras sporadiques, nous avons relevé une vitesse du vent dans les champs de $3,5 \text{ m.s}^{-1}$ dans le haras H4 et $0,6 \text{ m.s}^{-1}$ dans le haras H7.

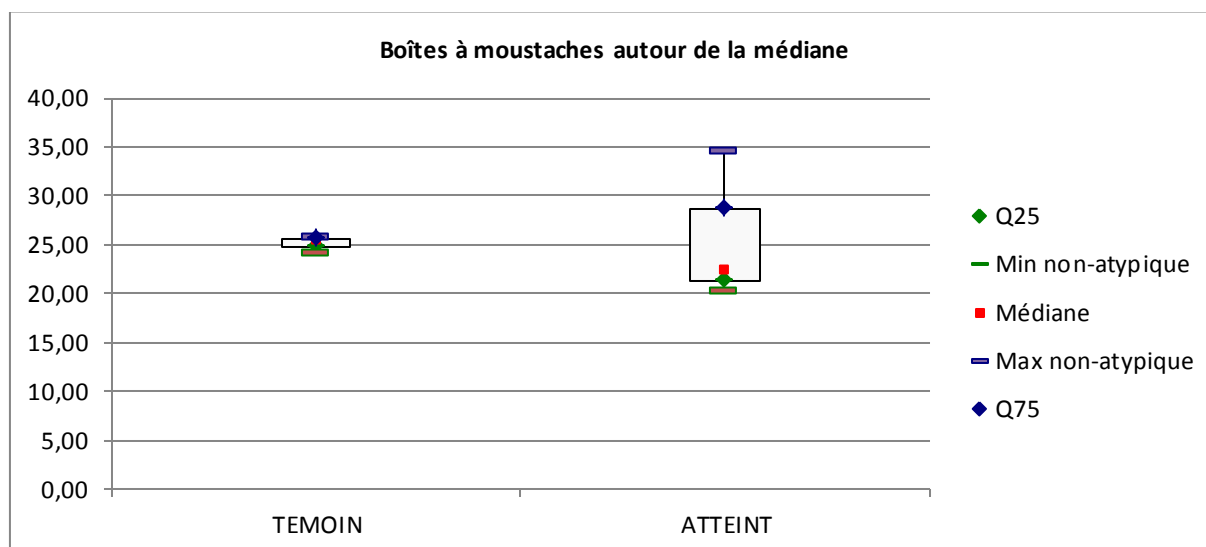
Tableau 25 : Vitesse du vent mesurée dans les champs des haras témoins (n=3) et atteints (n=6) par rapport au seuil de 1 m.s^{-1} .

Vitesse du vent dans les champs	$\leq 1 \text{ m.s}^{-1}$	$> 1 \text{ m.s}^{-1}$	Total
TEMOIN (n=3)	67%	33%	100%
ATTEINT (n=6)	33%	67%	100%

La vitesse du vent mesurée dans le champ était inférieure à 1 m.s^{-1} dans deux des trois haras témoins visités et supérieure à 1 m.s^{-1} dans 4 des 6 haras atteints visités. Cette différence n'est pas significative (Test exact de Fisher, $p=0,52$).

Nous étudions maintenant la température ambiante relevée au point le plus ensoleillé de chaque champ étudié, au début du prélèvement d'air.

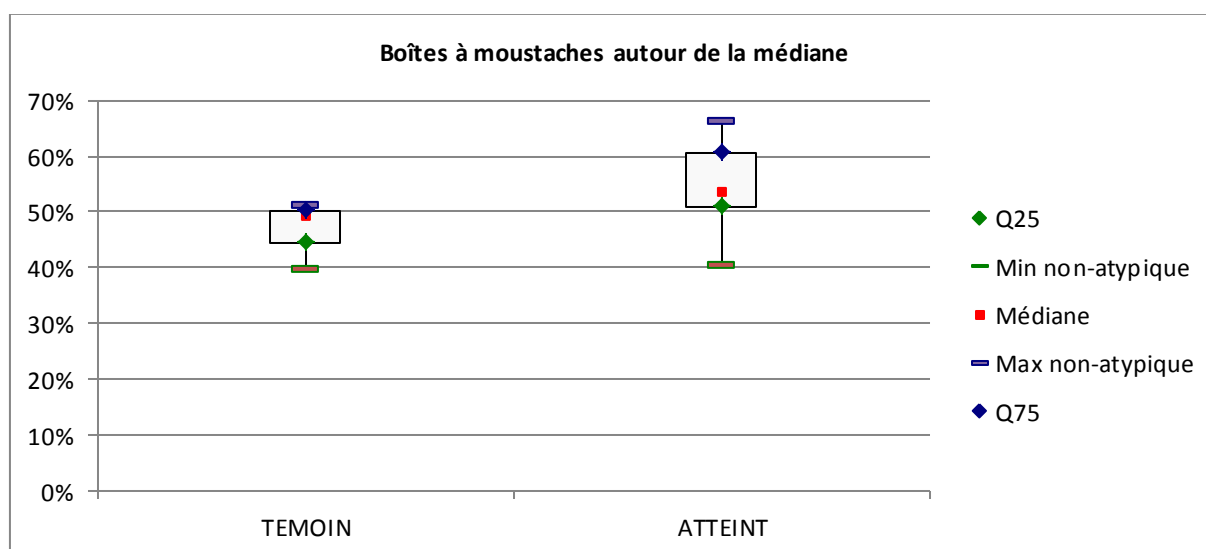
Figure 47 : Température en °C relevée dans chaque champ étudié dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6), au début du prélèvement d'air.



La température médiane relevée dans le champ dans les haras témoins est de 25,50°C, dans les haras atteints, elle est de 22,35°C, il ne semble pas y avoir de différence entre les deux lots. Dans les haras sporadiques, la température relevée est de 21,50°C dans le haras H4 et de 21,90°C dans le haras H7.

Nous étudions maintenant l'humidité de l'air dans les champs au moment du prélèvement d'air.

Figure 48 : Humidité de l'air dans les champs dans les haras témoins (n=3) et atteints (n=6), relevée au début du prélèvement d'air.

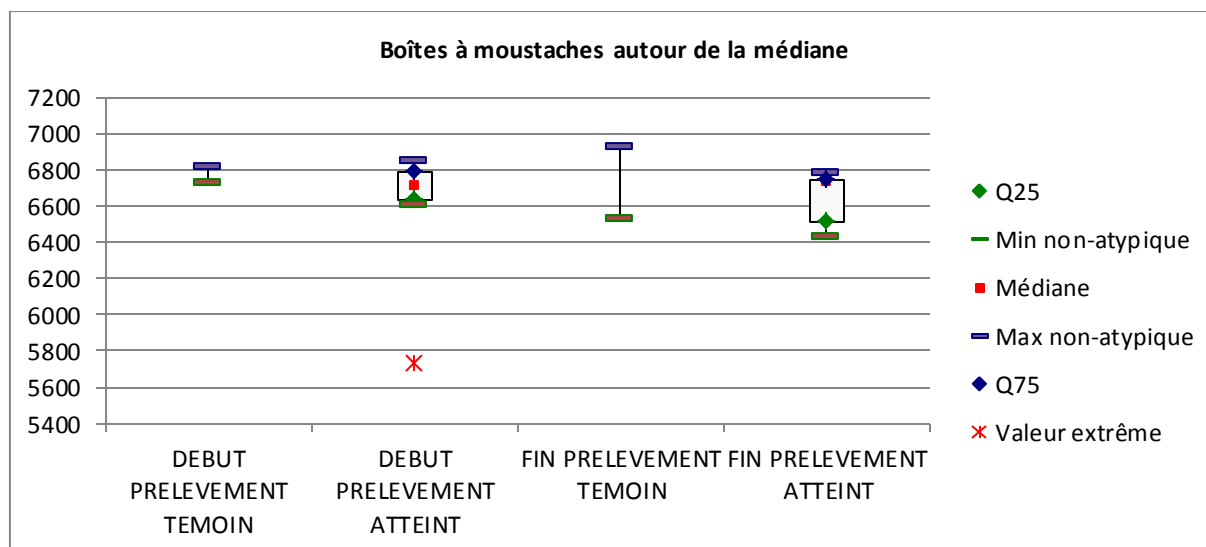


L'humidité médiane dans l'air du champ des haras témoins est 49,20 %, dans les haras atteints, l'humidité médiane est de 53,30 %. L'air semble être légèrement plus sec dans les haras témoins.

Dans les haras sporadiques, nous avons relevé une humidité de 55,60 % dans le haras H4 et une humidité de 71,00 % dans le haras H7.

Nous étudions maintenant le fonctionnement des CIP 10M en étudiant la vitesse de rotation des coupelles. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu mesurer la vitesse de rotation des coupelles dans le haras H5.

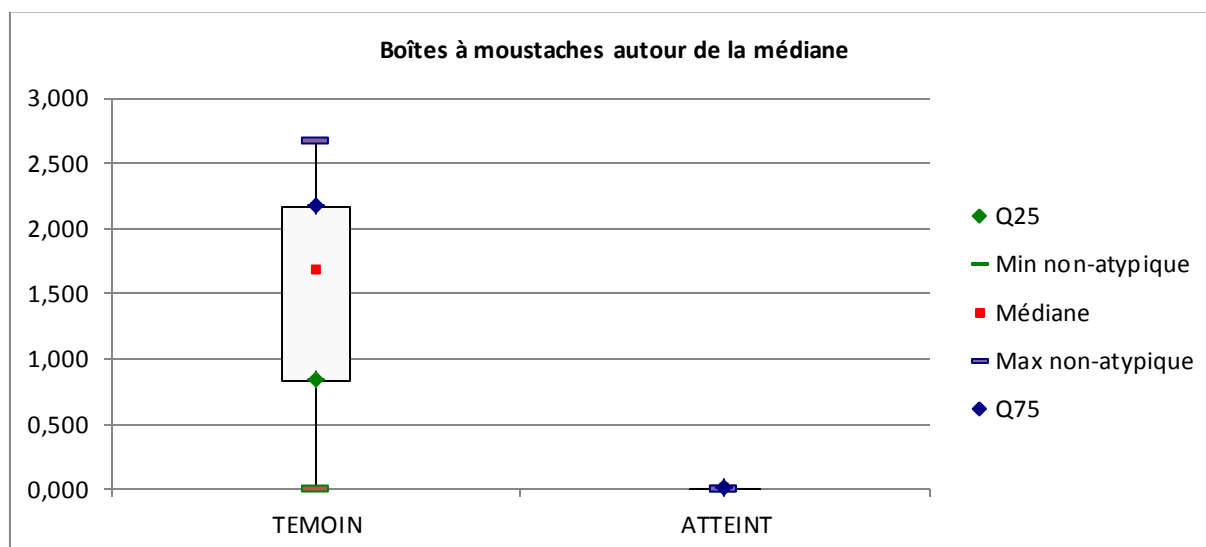
Figure 49 : Vitesse de rotation des coupelles des CIP 10M en début et en fin de prélèvement dans les haras témoins (n=2) et atteints (n=6).



L'ensemble des vitesses de rotation des coupelles mesurées pour les prélèvements d'air dans les champs des haras témoins et atteints, en début et en fin de prélèvement est homogène, hormis pour le haras H1 en début de prélèvement (5 730 tr/min, CIP n°1), la valeur de rotation à la fin de ce prélèvement est de 6 751 tr/min, il est donc possible que nous ayons eu une erreur de mesure en mesurant la vitesse alors que la rotation de la coupelle n'était pas stabilisée. Dans les haras sporadiques, les vitesses de rotation en début de prélèvement sont de 6 415 tr/min (CIP n°3) dans le haras H4 et de 6 356 tr/min (CIP n°2) dans le haras H7.

Nous retiendrons que les conditions de prélèvement sont semblables dans les haras témoins et atteints, tout en notant que le vent et l'humidité de l'air étaient légèrement plus faibles dans les haras témoins. Les disparités d'heure de début de prélèvement dans le champ sont dues au temps que nous attendions que le CIP 10M prévu par tirage au sort pour le champ soit disponible (fin du prélèvement précédent prévu pour ce CIP, puis nettoyage et préparation de l'appareil pour le prélèvement dans le champ).

Figure 50 : Concentration de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air sur le champ étudié dans les haras du lot témoin (n=3) et atteint (n=6).



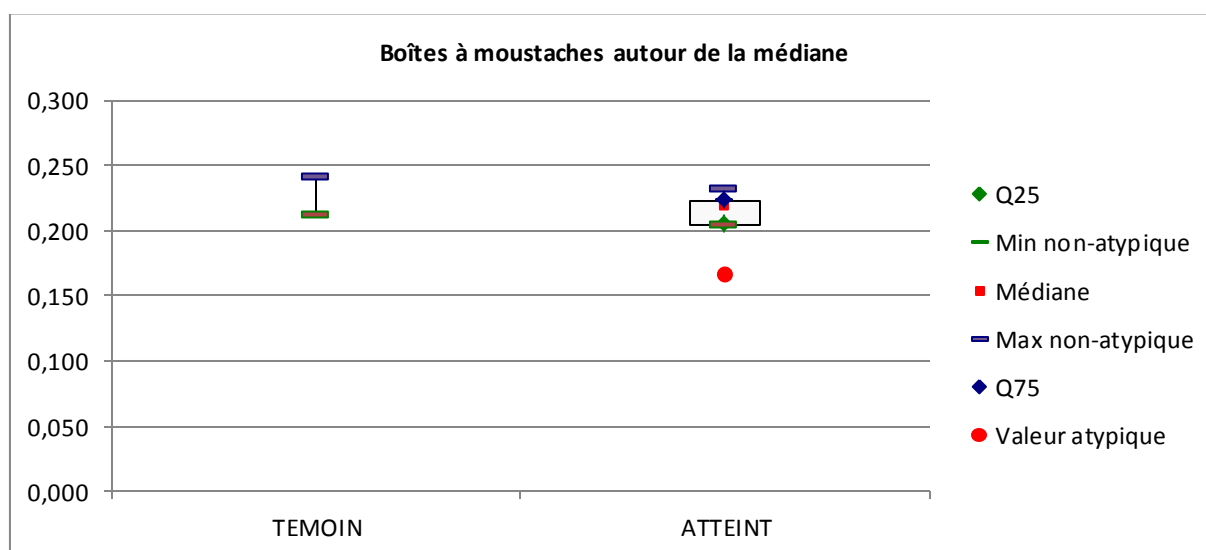
Rhodococcus equi virulent n'a été isolé que dans les champs de haras du lot témoin respectivement 1,67 UFC/m³ et 2,67 UFC/m³ dans les haras H5 et H6, soit une fréquence de 67 % (2/3) dans les haras témoins et 0% dans les haras atteints (0/6).

Rhodococcus equi non virulent a été isolé dans l'air du champ dans le haras témoin T0 (13,6 UFC/m³) et dans le haras atteint H8 (0,67 UFC/m³).

4.3.4.2. Isolement de *Rhodococcus equi* dans le sol du champ

Nous étudions l'humidité du sol du champ dans les haras témoins et atteints.

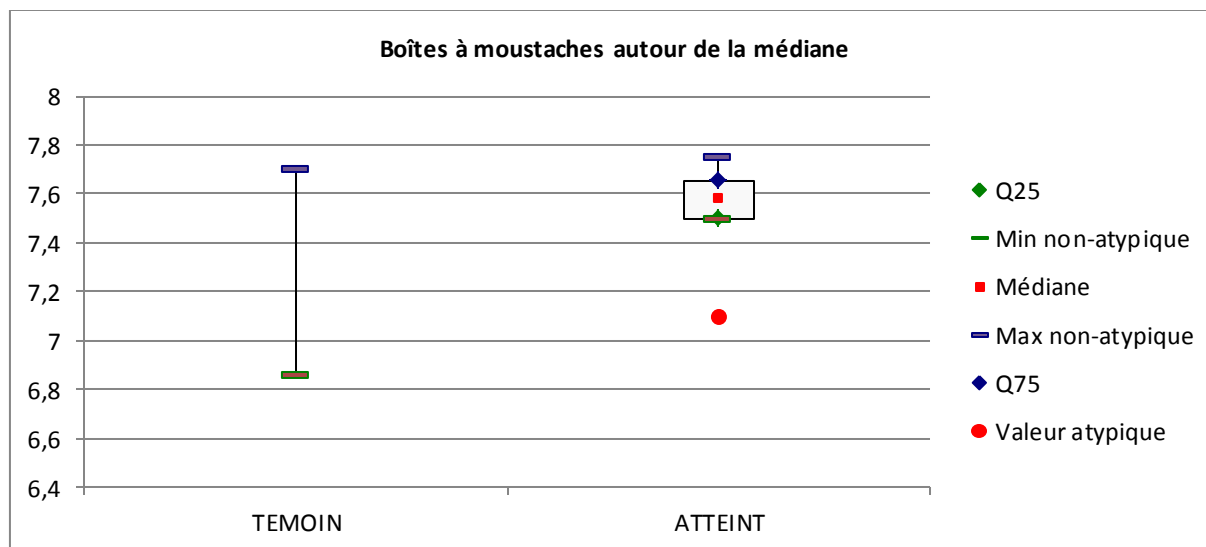
Figure 51 : Humidité de la terre du champ dans les haras témoins (n=2) et atteints (n=5).



Dans les haras témoins H5 et H6, nous avons respectivement mesuré une humidité de 24,10 % et de 21,15 % dans le sol du champ. Dans les haras atteints, la médiane de l'humidité de la terre du champ est de 21,80 %. Il ne semble pas y avoir de différence entre les haras témoins et atteints de notre échantillon. Dans les haras sporadiques, nous avons mesuré une humidité du sol du champ de 30,50 % dans le haras H4 et de 20,50 % dans le haras H7.

Nous étudions le pH du sol du champ dans les haras de notre échantillon.

Figure 52 : pH du sol dans les champs des haras témoins (n=2) et atteints (n=5).



Dans les haras témoins H5 et H6, nous avons mesuré respectivement un pH de 6,86 et 7,7. Dans les haras atteints, la médiane du pH dans le sol du champ est de 7,58. Il ne semble pas y avoir de différence entre les haras témoins et atteints de notre échantillon. Dans les haras sporadiques H' et H7, nous avons respectivement mesuré un pH de 6,9 et de 7,7 dans le sol du champ.

Rhodococcus equi virulent a été isolé dans un seul prélèvement de sol de champ, dans la terre autour de l'abreuvoir à 5 cm de profondeur dans le haras sporadique H4.

Tableau 26 : Tableau de contingence isolement de *Rhodococcus equi* non virulent dans le sol des champs dans les haras du lot témoin (n=3) et atteint (n=6). Nous considérons que *Rhodococcus equi* est présent sur le champ si il est retrouvé dans au moins un des six prélèvements de terre réalisés sur le champ étudié.

<i>Rhodococcus equi</i> non virulent isolé dans la terre du champ	NON	OUI	Total
TEMOIN (n=3)	67%	33%	100%
ATTEINT (n=6)	50%	50%	100%

Rhodococcus equi non virulent a été isolé dans le champ du haras témoin H5 ; des souches non virulentes ont été isolées dans le champ de 3 haras atteints au centre du champ, dans le haras H1 (surface et 5 cm), autour de l'abreuvoir dans le haras H2 (surface et 5cm), lors de notre seconde visite dans le haras R0 – H9 au centre du champ (5cm de profondeur). Il n'y a pas de différence

significative entre les haras témoins et atteints (test exact de Fisher $p=1$). Lors de notre première visite dans le haras R0 – H9, *Rhodococcus equi* non virulent a été isolé en grandes quantités dans le champ, à l'entrée et au centre en surface et à 5 cm, autour de l'abreuvoir à la surface. *Rhodococcus equi* non virulent a été isolé autour de l'abreuvoir à 5 cm de profondeur dans les deux haras sporadiques et en surface au centre du champ dans le haras H4.

Parmi les 14 prélèvements positifs pour *Rhodococcus equi* non virulent dans le sol des champs, sept ont été réalisés en surface et sept ont été réalisés à 5 cm de profondeur. Il ne semble donc pas y avoir de différence entre la présence de *Rhodococcus equi* non virulent en surface et en profondeur dans le champ.

Parmi les 14 prélèvements de sol de champ dans lesquels nous avons isolé *Rhodococcus equi* non virulent, 11 ont été réalisés lors de nos 6 premières visites (soit 36 prélèvements de sol), entre le 30 Mai 2012 et le 29 Juin 2012 (comprenant la première visite dans le haras R0 – H9). Lors de nos six dernières journées de prélèvements du 23 juillet au 24 Août 2012 (comprenant notre deuxième visite dans le haras R0 – H9), nous avons isolé *Rhodococcus equi* non virulent 3 fois dans la terre des champs (sur 36 prélèvements de sol au total). La différence dans la fréquence d'isolement de *Rhodococcus equi* dans le sol du paddock avant le 30 Juin 2012 et après le 1^{er} Juillet 2012 est statistiquement significative (test du Chi2 $p<0,017$). Il semble donc que *Rhodococcus equi* non virulent soit plus présent dans le sol jusqu'au mois de Juin, puis absent ou présent en plus faibles quantités aux mois de Juillet et Août.

5. Discussion

5.1. Caractéristiques des élevages étudiés, comparaison des élevages atteints et témoins

Nous avons réalisé notre étude parmi les élevages reconnus comme étant les plus à risque de présenter des cas de pneumonies à *Rhodococcus equi* chez les poulains en Basse-Normandie, c'est-à-dire les élevages présentant plus de 15 naissances par an. En nous limitant à cette catégorie restreinte d'élevages, nous avons pour objectif de déterminer les facteurs de risques les plus corrélés à la présence de cas de rhodococcose pulmonaire.

Les élevages de notre échantillon sont assez homogènes dans leur composition. Ce sont tous des élevages « professionnels » c'est-à-dire gérés par du personnel à temps plein et dont c'est l'activité principale, créés entre 1970 et 2009 (sans différence dans la répartition entre les haras témoins et atteints). La plupart des haras élèvent des chevaux de course (Pur-Sang ou Trotteur Français) et le haras H6 élève des chevaux de Selle Français destinés au saut d'obstacles.

Par définition la prévalence dans les haras témoins est de 0% de 2009 à 2012. Parmi les haras présentant des cas de rhodococcose sur les poulains, nous avons distingué *a posteriori* deux types de haras. Les haras atteints présentent des cas régulièrement tous les ans entre 2009 et 2012 avec une prévalence approximative sur cette période de 3 à 15 %. Les haras sporadiques sont des haras dans lesquels un ou deux cas sont survenus pour une année donnée entre 2009 et 2012 et présentent une prévalence approximative de 1 % pour cette période. Outre la variabilité liée au statut du haras, nous avons aussi noté que la prévalence de la rhodococcose pulmonaire dans les haras atteints varie en fonction de l'année, en particulier en 2012 les haras atteints ont présenté significativement moins de cas que entre 2009 et 2011. Ceci est certainement lié à l'influence du climat, l'année 2012 ayant été très pluvieuse tout au long de l'été.

Les haras de notre échantillon hébergent entre 65 et 200 chevaux et ont eu en 2012 entre 12 et 55 naissances de poulains ; sans différence significative entre les haras témoins et les haras atteints. La surface totale en herbe et la surface réservée à l'élevage sont identiques entre les haras témoins et les haras sains. En revanche, dans les haras atteints, nous retrouvons une plus grande densité de poulains par hectare par rapport aux haras témoins : tous les haras atteints ont une densité de poulains supérieure à 0,4 poulain/ha alors que tous les haras témoins ont une densité de poulains inférieure à ce seuil, la différence entre les deux lots est significative (Test exact de Fisher, $p=0,012$).

Il n'y a pas de différence entre les élevages des lots témoin et atteint dans le rapport nombre de chevaux par personnel travaillant sur le haras. 56 % des éleveurs de l'échantillon estiment avoir dépassé leur capacité d'accueil maximale sans différence entre les élevages témoins et atteints.

Concernant le fonctionnement des élevages, il n'y a aucune différence significative entre les haras témoins et les haras atteints concernant l'accueil de poulinières extérieures, le partage des herbages et des installations entre les animaux résidents du haras et les animaux extérieurs de

passage. Il n'y a pas de différence significative entre les haras des lots témoin et atteint dans l'organisation et la gestion des bâtiments et des locaux d'élevage.

Dans les mesures d'hygiène ayant un lien avec la prévention des infections par *Rhodococcus equi*, nous ne trouvons aucune différence significative entre les haras témoins et les haras atteints pour la vaccination des animaux, la présence de naissances tardives et les modalités de suivi du transfert d'immunité passive de la poulinière à son poulain (Colotest® et Snap Foal®).

Pour résumer, en étudiant uniquement les élevages les plus à risque de présenter des infections par *Rhodococcus equi*, le seul critère réellement discriminant entre les élevages témoins et atteints de l'échantillon, est la densité des poulains. Tous les élevages atteints ont une densité de poulains supérieure à 0,4 poulain/hectare. Aucun des autres facteurs de risques décrit en Basse-Normandie à plus large échelle précédemment (TAPPREST *et al.*, 2012), n'est réellement discriminant pour prédire le statut témoin ou atteint des élevages de notre échantillon. L'absence de corrélation des facteurs de risques sur les élevages de la même région à 7 ans de différence pourrait s'expliquer par un nombre insuffisant de haras dans notre échantillon induisant un manque de puissance statistique pour nous permettre de retrouver les facteurs de risques décrits précédemment. Lors de notre recrutement, nous nous sommes focalisés sur les élevages présentant plus de 15 naissances par an, ce faisant nous avons certainement induit un biais de sélection, les résultats obtenus dans notre échantillon ne peuvent être étendus à l'ensemble des élevages de la région, mais nous permettent de comparer les haras témoins et atteints en limitant l'influence des facteurs de risques autres que la présence de *Rhodococcus equi* dans l'environnement des poulains.

5.2. Mode de recrutement des haras et déroulement des séances de prélèvements

Avant de contacter chaque élevage, nous avons d'abord étudié les données du SIRE afin de nous assurer du nombre de naissances dans l'élevage ces dernières années afin d'éliminer d'emblée tous les haras déclarant moins de 15 naissances par an. Le choix de ce seuil nous a permis d'étudier la population d'élevages la plus à risque, nous avons utilisé le seuil de 10 naissances plutôt que 15 (TAPPREST *et al.*, 2012), afin d'inclure un plus grand nombre de haras afin d'avoir suffisamment de haras à visiter à la fin de notre processus de recrutement. La consultation des archives des rapports d'autopsies de poulains à l'ANSES-Dozulé nous a permis de compléter nos informations en ayant une première idée du statut des haras par rapport à la rhodococcose, cette première idée a été ajustée après appel au vétérinaire traitant du haras. Ainsi en appelant chaque élevage, nous avons déjà des connaissances fiables sur son statut vis-à-vis de la rhodococcose. Dans notre échantillon final, nous avons donc pu étudier 9 haras (témoins + atteints) sur les 11 visités en étant sûrs de notre classement vis-à-vis de la rhodococcose. Rétrospectivement, il nous était impossible de prévoir l'apparition d'un cas en 2012 dans le haras H4, en revanche nous aurions pu éliminer le haras H7 de l'échantillon, étant donné qu'il ne présente plus de cas depuis 2009. Le maintien du haras H7 a été décidé sciemment, quand nous l'avons visité le 25 juillet 2012, aucun autre haras de notre liste n'était éligible pour que nous allions faire nos prélèvements (éleveur non disponible ou pluie dans les jours précédents) ; à cette date nous étions conscients du statut « douteux » de ce haras par rapport à *Rhodococcus equi*, mais nous devions avoir un échantillon plus grand dans lequel nous aurions

certainement eu d'autres élevages avec ce statut. Enfin concernant le haras atteint H10, nous avons choisi de l'inclure dans l'étude malgré l'absence de poulain autopsié, après avoir vérifié auprès du vétérinaire traitant et de l'éleveur la présentation des cas, la réponse aux traitements mis en place et les résultats des prélèvements réalisés sur les poulains atteints.

Pour la répartition des jours de prélèvements, nous nous sommes imposés des critères objectifs et stricts, afin de limiter au maximum l'effet du climat sur nos résultats. Il nous était impossible vis-à-vis des éleveurs de venir à l'improviste ; cela nous aurait permis d'être surs que les observations que nous faisons dans les bâtiments et les pâtures étaient bien révélatrices de la gestion quotidienne de l'élevage. Cependant l'ensemble des éleveurs nous ayant accueillis ont fait preuve d'un réel intérêt pour notre travail et les résultats concernant leur élevage ; en particulier dans les haras atteints, ils étaient en demande de réponses et de conseils pour lutter contre la maladie. Nous pouvons donc penser qu'ils n'auront pas cherché à masquer les défauts de leur installation le jour de notre visite. De plus, notre visite était prévue en général la veille pour le lendemain pour des raisons météorologiques, ce qui ne laissait pas beaucoup de temps pour un « grand ménage ». Enfin, nous nous sommes reposés sur un grand nombre de mesures objectives (distance bâtiment-fumière, état des sols, superficies...), sur lesquelles il était impossible de tricher.

Les restrictions météorologiques que nous nous sommes fixés pour aller visiter les élevages (principalement absence de pluie dans les 3 jours précédents) semblent nous avoir permis d'obtenir des prélèvements dans des conditions relativement homogènes entre les haras témoins et atteints en termes de température et d'humidité de l'air. Dans aucun des haras visités, nous n'avons trouvé de champs ou de paddock avec une terre humide en surface. Concernant la vitesse du vent, elle participe à l'assèchement du sol et à l'aérosolisation des poussières, mais elle nous semble plus reliée au climat du jour de prélèvement et à la position géographique de la surface étudiée. La vitesse du vent semble plus élevée dans les paddocks et les champs des haras atteints que dans les élevages témoins.

Après avoir rempli le questionnaire épidémiologique avec chaque éleveur, nous avons déterminé les endroits où nous allions faire nos prélèvements (un box, un champ, un paddock). La détermination des lieux de prélèvement ne pouvait se faire que guidée par le propriétaire lui-même. Les critères que nous avons fixés dans chaque haras visités étaient de faire des prélèvements sur des surfaces apparaissant comme les plus à risque de contaminer les poulains :

- beaucoup de poulains sur la surface les jours précédents et idéalement le jour du prélèvement,
- grande quantité de poussière,
- présence de cas sur des animaux étant passés sur la surface étudiée.

Ces critères servaient à orienter les éleveurs dans les surfaces qu'ils nous proposaient, mais le choix final reposait en grande partie sur la décision de l'éleveur lui-même. En passant dans les haras, nous avons vérifié que la surface sur laquelle nous travaillions était représentative de l'ensemble de la structure.

Afin de travailler dans des conditions les plus semblables possibles dans tous les haras, les prélèvements d'air devaient être réalisés dans l'ordre suivant :

1. début du prélèvement dans le paddock,
2. début du prélèvement d'air dans le box environ 30 minutes après le lancement du prélèvement dans le paddock,
3. début du prélèvement dans le champ à la fin des prélèvements dans le paddock et dans le box.

Dans les haras H1, H6, H7 et H10, ceci n'a pas été le cas :

- Dans le haras H1, nous étions en début de protocole et nous n'avons pas fait attention à ce point. Cependant, le relevé des conditions climatiques le matin dans le champ et l'après-midi dans le paddock montre que les conditions de prélèvement étaient semblables pour les deux surfaces.
- Dans les haras H6, H7 et H10, il était impossible à l'éleveur de mettre une jument supportant le CIP10 M dans le paddock sur lequel nous devons faire le prélèvement dans la matinée. Il n'y a que dans le haras H7 que nous trouvons une réelle modification des conditions climatiques entre le matin (20,9 °C et 71,0 % d'humidité) et l'après-midi (28,1 °C et 52,6 % d'humidité).

5.3. Protocoles de prélèvements et mise en évidence de *Rhodococcus equi*

5.3.1. Recherche de *Rhodococcus equi* dans l'air

Nous avons utilisé dans cette étude le protocole de prélèvements d'air pour analyse microbiologique mis au point par D. PHILIPPOT (PHILIPOT, 2012) avec le CIP10 M. Ce protocole permet la mise en évidence de *Rhodococcus equi* à l'aide d'un échantillonneur de type inpigment qui récolte les bactéries contenues dans l'air sur un milieu liquide. Nous avons utilisé, comme proposé dans le protocole, du liquide BHI pour la recherche de *Rhodococcus equi*. Lors de la mise au point du protocole, il a été décidé de réaliser des prélèvements de 900 L d'air à un débit de 10 L.min⁻¹ soit 90 minutes de prélèvement avec un appareil fixé sur le licol d'une poulinière suitée. Les avantages principaux de cette technique sont :

- Une bonne représentativité de l'exposition des animaux à la bactérie par un prélèvement de longue durée, réalisé par un appareil embarqué et situé proche des naseaux des chevaux,
- Une facilité de traitement des prélèvements et la possibilité de réaliser des dilutions pour assurer un comptage juste sur les géloses.

La problématique de l'évaporation du BHI est connue depuis la mise au point du protocole de prélèvements (PHILIPOT, 2012). Le CIP10 M a été comparé à d'autres échantillonneurs d'air, pour différents volumes d'air prélevés. Le CIP10 M ayant un débit d'aspiration plus faible et plus proche du débit ventilatoire des poulains que les autres échantillonneurs, l'augmentation du volume d'air prélevé se traduit par une forte augmentation du temps de prélèvement. A 600 L d'air prélevé, le CIP10 M tourne pendant 60 minutes et malgré l'évaporation du liquide de prélèvement, il a été

prouvé comme étant aussi sensible que l'Air Idéal 3P®. Afin d'augmenter sa sensibilité, il a été décidé alors de passer de 600 à 900 L d'air prélevé et les premiers résultats sur le terrain étaient en accord avec les manipulations en environnement contrôlé au laboratoire de l'ANSES-Dozulé.

Voulant compléter les données sur l'influence du temps de prélèvement sur la viabilité de *Rhodococcus equi*, nous avons mis au point et réalisé un protocole de quantification des bactéries viables présentes en fin de prélèvement dans les coupelles, en connaissant au départ le nombre de bactéries présentes dans la coupelle et en faisant varier le temps de prélèvement. Pour des raisons techniques et de personnel, cette expérimentation n'a pu être mise en pratique qu'après nos prélèvements dans les haras. Nous avons observé que l'évaporation du BHI se fait suivant une régression linéaire de faible pente de 0 à 60 minutes de prélèvement. Puis entre 60 et 90 minutes de prélèvement, l'évaporation s'accélère fortement. Après 180 minutes de prélèvement, toutes les coupelles sont constatées vides.

Le pourcentage de viabilité de *Rhodococcus equi* suit là une courbe semblable à celle de l'évaporation du BHI. Dans les coupelles témoins sans rotation (très faible évaporation du BHI), nous avons noté une multiplication des bactéries de l'ordre de 25 % de bactéries en plus sans différence entre les deux manipulations⁷. A 30 et 60 minutes, le taux de survie de *Rhodococcus equi* virulent semble suivre une régression linéaire de faible pente pour atteindre 85 % de survie à 60 minutes dans la manipulation 1. Dans la manipulation 2, à 90 minutes, la survie de *Rhodococcus equi* n'est plus que de 26 %.

Notre hypothèse est que la survie de *Rhodococcus equi* est très fortement corrélée à la concentration du BHI dans la coupelle de prélèvement. D'autres paramètres pourraient expliquer une diminution du nombre de bactéries au cours du prélèvement comme une « sortie » des bactéries de la coupelle à cause du flux d'air, mais les géloses posées dans l'enceinte avec les coupelles en rotation n'ont pas été contaminées par *Rhodococcus equi*. Il est donc fortement probable que dans nos prélèvements, l'évaporation du BHI sous l'effet du flux d'air, ait entraîné une concentration des nutriments contenus dans celui-ci, induisant un environnement hyper-osmotique non propice à la survie de *Rhodococcus equi*.

Nous n'avons pas évalué l'effet du temps passé par les bactéries en contact avec le milieu BHI plus ou moins concentré entre le moment de leur collecte et le moment de la mise en culture. Avant de reproduire notre protocole de prélèvements d'air, il serait intéressant d'introduire une quantité connue de bactéries dans des solutions de BHI de concentrations variables, puis d'étudier la survie de *Rhodococcus equi* en fonction de la concentration de la solution de BHI et en fonction du temps passé dans la solution.

Contrairement à nos conditions expérimentales, sur le terrain, toutes les bactéries ne sont pas présentes dans la solution de BHI au début du prélèvement, elles viennent se collecter progressivement, de ce fait elles n'ont pas toutes le même temps d'exposition à la solution de BHI concentrée. De plus sur le terrain, la mise en culture n'intervient qu'à notre retour au laboratoire, soit plusieurs heures après la fin du prélèvement. Pendant tout le temps du transport, les

⁷ Dans la manipulation 1, les coupelles étaient récupérées 60 minutes après la mise en place de la solution avec une concentration connue en *Rhodococcus equi* virulent ; dans la manipulation 2, les coupelles témoins étaient récupérées après 90 minutes.

échantillons sont stockés dans une enceinte isolée et réfrigérée afin d'inhiber la croissance des bactéries. Pendant ce temps *Rhodococcus equi* est donc en contact avec une solution concentrée en BHI.

Dans l'état actuel de nos connaissances, nous pouvons présumer que nous avons sous-estimé la quantité *Rhodococcus equi* prélevée dans l'air pour tous les haras présents sans savoir dans quelle proportion. L'expérimentation proposée ci-dessus permettrait de mieux quantifier la perte de viabilité de *Rhodococcus equi* en fonction de la concentration de la solution et du temps de contact. Ainsi nous pourrions adapter la durée des prélèvements d'air dans le futur et les conditions d'acheminement des prélèvements au laboratoire. En revanche nous avons montré que la technique de prélèvement n'entraîne pas de perte du plasmide de virulence sur les souches retrouvées en culture. Le plasmide de virulence, confère une meilleure résistance de *Rhodococcus equi* aux conditions défavorables (sécheresse, pH extrême...). Il serait donc intéressant de répéter cette étude avec des souches non virulentes de *Rhodococcus equi* uniquement, ainsi qu'en introduisant au départ des souches virulentes et non virulentes en même quantité.

Le suivi des vitesses de rotation des CIP10 M au début et à la fin de chaque prélèvement montre qu'il n'y a pas eu d'incidents dans leur fonctionnement et aucune variation significative de la vitesse de rotation des appareils. La corrélation entre la vitesse de rotation et le débit d'aspiration de l'air par le CIP est réglée en usine par la société fabriquant les appareils. Notre mesure de vitesse de rotation ne nous permet pas d'extrapoler des différences de vitesse d'aspiration d'air, mais nous permet de savoir que les trois appareils ont fonctionné de manière homogène durant toute la saison de prélèvements en 2012.

Avant d'étudier les résultats de la recherche de *Rhodococcus equi* dans les haras témoins et atteints de notre échantillon, nous pouvons comparer les résultats sur deux années consécutives pour les haras visités lors de l'étude de PHILIPOT en 2011 et au début de l'étude de 2012. Vu l'effet que peut avoir la météo sur la récolte de *Rhodococcus equi* dans l'air, nous comparons les valeurs de l'année 2012 avec les séances de prélèvement de l'année 2011 où les conditions météorologiques étaient les plus semblables.

Tableau 27 : Comparaison des prélèvements d'air dans le champ des haras T0 (témoin) et R0 (atteint) entre la validation de la technique en 2011 et notre étude en 2012.

Haras	Date visite	Vent	Temp	Humidité	Poussière	Chargement	Volume CIP	Concentratio n <i>R. equi</i> virulent	Concentratio n <i>R. equi</i> non virulent
T0	18/05/2011	1,8	19,1	49,50 %	A	1	0,8	0	75,1
T0	30/05/2012	1	22,8	54,40 %	A	2	0,6	0	6,1
R0	01/06/2011	0,1	23,1	48,90 %	B-	1	1	16,7	8,4
R0	10/08/2012	2,3	19,9	63,50 %	B	1	0,85	2,8	0

Tableau 28 : Comparaison des prélèvements d'air dans le paddock des haras T0 (témoin) et R0 (atteint) entre la validation de la technique en 2011 et notre étude en 2012.

Haras	Date visite	Vent	Temp	Humidité	Poussière	Chargement	Volume CIP	Concentrati on <i>R. equi</i> virulent	Concentrati on <i>R. equi</i> non virulent
T0	18/05/2011	1,8	28,7	35%	A	2	0,45	0	3,56
T0	30/05/2012	0,8	25,9	49,20%	A	2	0,45	0	13,6
R0	01/06/2011	4,2	21	62%	B	7	0,8	0	6,7
R0	10/08/2012	4,3	22,7	53,50%	B	5	0,5	0	0

Malgré la différence de climat en Basse-Normandie entre 2011 et 2012, les observations concernant l'état de poussières dans le champ et le paddock étudié dans chacun de ces deux élevages sont très proches pour les deux années consécutives. En 2012, nous avons retrouvé *Rhodococcus equi* dans l'air en moins grande concentration que l'année précédente (à part les souches non virulentes dans le paddock du haras témoin T0), ceci peut contribuer à expliquer que nous n'avons pas détecté *Rhodococcus equi* non virulent dans le haras R0 où il était présent en faible concentration l'année précédente. Nous observons que le BHI s'est plus évaporé dans les prélèvements de l'année 2012 qu'en 2011 sans que l'on puisse trouver de lien avec les conditions météorologiques relevées en même temps que les prélèvements. Au vu de l'importance de l'évaporation du BHI sur la viabilité des bactéries, il nous paraît impossible de conclure sur la variation de la concentration en *Rhodococcus equi* en aérosols entre 2011 et 2012. D'un point de vue qualitatif, à part pour les souches non virulentes du haras R0, nous retrouvons *Rhodococcus equi* aux mêmes endroits d'une année sur l'autre. *Rhodococcus equi* n'a pas été isolé dans les boxes d'aucun de ces deux haras ni en 2011 ni en 2012.

Nous allons maintenant étudier uniquement les résultats des prélèvements réalisés en 2012 dans les haras témoins et les haras atteints. Les conditions climatiques dans les boxes, les paddocks et les champs étaient semblables entre les deux lots de haras, si ce n'est :

- Une humidité de l'air un peu plus élevée dans les paddocks des haras atteints par rapport aux paddocks des haras témoins. En prenant comme seuil d'humidité 50,00%, la différence de répartition entre haras témoins et atteints n'est pas significative (Test exact de Fisher, $p=0,083$), cependant au vu de la valeur du p , nous pensons que ce résultat pourrait révéler une différence entre les haras des deux lots étudiés, mais que nous manquons de puissance statistique en raison du nombre de haras visités ;
- En prenant comme seuil $1\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ dans les paddocks des haras atteints, la vitesse du vent est supérieure à celle dans les paddocks des haras témoins (Test exact de Fisher, $p=0,048$).

Ces sont les deux seules différences de conditions climatiques que nous avons notées entre les deux lots de haras étudiés. Nous pouvons noter que ces conditions jouent en sens inverse sur l'aérosolisation de *Rhodococcus equi*, un air humide devrait plutôt limiter la mise en suspension de poussières alors qu'un vent plus rapide la favorise. A notre connaissance dans les recherches précédemment effectuées sur la présence de *Rhodococcus equi* dans l'air, les auteurs ont seulement

relevé les conditions climatiques au moment du prélèvement. Nous avons mis au point un processus de choix de la date de visite qui nous a permis d'effectuer des prélèvements dans des conditions globalement comparables entre les haras témoins et les haras atteints, en particulier pour la température ambiante et l'humidité du sol qui sont les deux paramètres les plus corrélés à la présence de *Rhodococcus equi* dans l'air, en particulier du paddock, dans l'étude menée en Australie (MUSCATELLO *et al.*, 2006).

Lors de l'exploitation de dénombrement de *Rhodococcus equi* sur les boîtes de culture, nous avons prêté attention à la répartition des colonies en fonction de la dilution. Conformément à la norme AFNOR NF EN 13098 :2000-12, nous avons vérifié qu'il y avait moins de colonies dans les boîtes ensemencées avec une solution diluée que dans les boîtes ensemencées avec l'échantillon pur. De tous nos prélèvements d'air, le seul pouvant être jugé anormal a été dans le paddock du haras H7 dans lequel la seule colonie de *Rhodococcus equi* retrouvée a poussé sur la boîte avec une dilution à 10^{-1} alors qu'aucune colonie n'a été dénombrée dans la boîte avec l'échantillon pur. Nous avons donc un système de dilution et de dénombrement des colonies vraisemblable.

Rhodococcus equi virulent a été isolé dans le box d'un haras témoin (H5) et *Rhodococcus equi* non virulent a été isolé dans le box d'un haras atteint (H2). Dans notre échantillon, le box ne semble pas être un lieu important pour l'inhalation de *Rhodococcus equi* par les poulains, contrairement à ce qui est décrit en Irlande, où le climat est comparable à celui de la Basse-Normandie (MUSCATELLO, *et al.*, 2006). Nos appareils étaient situés proches de la litière des animaux, mais nous avons noté que dans les haras où nous avons fait nos prélèvements, la litière était propre voir neuve la plupart du temps au moment du prélèvement d'air dans le box. La litière était aussi propre dans tous les boxes que nous avons vus dans ces haras, il nous semble peu probable que les propriétaires aient tous amélioré la propreté de tous les boxes uniquement pour notre visite. La grande propreté de la litière peut être rapportée à la taille des haras, nous avons uniquement visité des haras avec un grand nombre de chevaux, gérés par des professionnels conscients de l'importance des mesures d'hygiène. Par ailleurs, pendant nos prélèvements, les animaux présents dans le box sont souvent restés très immobiles, probablement parce qu'ils étaient un peu dérangés par le bruit des appareils dont les vibrations résonnaient un peu dans les boîtes en bois. L'association d'une litière neuve et propre avec une diminution des mouvements des animaux a très probablement considérablement limité l'aérosolisation de *Rhodococcus equi* dans les boxes.

Dans les paddocks, *Rhodococcus equi* virulent a été isolé à nouveau dans le haras témoin H5, ainsi que dans les haras atteints R0-H9 et H10 et dans le haras sporadique H7. Des souches non virulentes ont été isolées dans les haras T0 (témoin) et H10 (atteint).

Enfin dans les champs, nous avons isolé *Rhodococcus equi* virulent dans les haras témoins H5 et H6 et dans aucun haras atteint. Des souches non virulentes ont été isolées dans le haras témoin T0 et dans le haras atteint H8.

Etant donné la perte de sensibilité dans la détection de *Rhodococcus equi* par mise en culture après l'évaporation du BHI, nous ne pouvons pas nous fier aux concentrations que nous avons calculées pour l'isolement de la bactérie dans l'air. D'un point de vue qualitatif, il semble que *Rhodococcus equi* virulent soit plus présent dans les haras témoins de notre échantillon que dans les haras atteints. Ce résultat ne corrobore pas les études précédemment menées et doit être abordé

avec d'autant de précautions que nous travaillons sur un faible nombre de haras. Des prélèvements supplémentaires ont été réalisés en 2013 avec le même protocole et sont en cours d'exploitation.

5.3.2. Recherche de *Rhodococcus equi* dans le sol

Rhodococcus equi n'a été isolé sur le sol d'aucun box. La recherche de la bactérie se faisait à partir d'une lingette d'eau peptonée apposée sur le sol. Ceci doit être relié au faible taux d'isolement de *Rhodococcus equi* dans l'air du box. La propreté des boxes que nous avons visités, diminue probablement la charge de la bactérie dans l'environnement. En 2011, aucune souche de *Rhodococcus equi* n'avait été isolée avec ce même procédé, il serait alors intéressant de vérifier que l'eau peptonée convient à la survie de *Rhodococcus equi* pendant son transport jusqu'au laboratoire. Si cela est confirmé, il semblerait que dans les haras que nous avons visités, les boxes ne soient pas un lieu à fort risque de contamination pour les poulains.

Dans les paddocks, *Rhodococcus equi* virulent n'a été isolé dans aucun des haras témoins et la bactérie a été isolée dans quatre des six paddocks des haras atteints, le plus souvent à 5 cm de profondeur ($p=0,04$). Le seul prélèvement de surface dans lequel *Rhodococcus equi* virulent a été retrouvé (concentration de 800 UFC/gramme de terre) a été réalisé dans le haras H2 où *R. equi* n'a pas été isolé dans l'air du paddock.

Tableau 29 : Corrélation entre l'isolement de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air et dans le sol dans les paddocks.

Rhodococcus equi virulent isolé		Dans le sol	
		OUI	NON
Dans l'air	OUI	2 2 atteints	2 1 sporadique (H7) 1 témoin
	NON	4 1 sporadique (H4) 3 atteints	3 2 témoins 1 atteint (H1)

Parmi les élevages de notre échantillon, les seuls pour lesquels nous avons isolé *Rhodococcus equi* virulent dans le sol et dans l'air du paddock sont des élevages atteints. Cependant, nous remarquons que dans 55 % (6/11) des élevages visités, il n'y a pas de corrélation entre l'isolement de la bactérie virulente entre l'air et le sol.

Des souches non virulentes de *Rhodococcus equi* ont été isolées en surface et à 5 cm de profondeur sans qu'il n'y ait de différence dans la fréquence d'isolement en fonction de la profondeur du prélèvement. En revanche, toutes les souches non virulentes ont été isolées dans la terre du paddock lors des séances de prélèvement avant le 1^{er} juillet. Il n'y a pas de corrélation entre les isolements dans le sol et dans l'air de *Rhodococcus equi* non virulent et le statut du haras.

Tableau 30 : Corrélation entre l'isolement de *Rhodococcus equi* non virulent dans l'air et dans le sol dans les paddocks.

Rhodococcus equi virulent isolé		Dans le sol	
		OUI	NON
Dans l'air	OUI	1 <i>1 témoin</i>	1 <i>1 atteint</i>
	NON	2 <i>2 atteint (H2&H3)</i> <i>1 sporadique (H4)</i>	6 <i>2 témoins</i> <i>3 atteints</i> <i>1 sporadique (H7)</i>

Dans les champs, *Rhodococcus equi* virulent n'a été isolé que dans le sol du haras sporadique H4, à 5 cm de profondeur. Il n'y a aucun haras pour lequel *Rhodococcus equi* virulent a été isolé dans le sol et dans l'air.

Tableau 31 : Corrélation entre l'isolement de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air et dans le sol dans les champs.

Rhodococcus equi virulent isolé		Dans le sol	
		OUI	NON
Dans l'air	OUI	0	2 <i>2 témoins (H5&H6)</i>
	NON	1 <i>1 sporadique (H4)</i>	8 <i>6 atteints</i> <i>1 sporadique</i> <i>1 témoin</i>

Rhodococcus equi non virulent a été isolé dans 6 haras, pour aucun de ces haras nous n'avons retrouvé de souches non virulentes dans l'air du champ. Comme dans le paddock, les souches non virulentes sont significativement plus souvent isolées dans les prélèvements avant le 1^{er} juillet ($p=0,017$). Nous ne retrouvons aucune corrélation entre l'isolement de *Rhodococcus equi* non virulent dans l'air et dans le sol dans les champs.

Tableau 32 : Corrélation entre l'isolement de *Rhodococcus equi* non virulent dans l'air et dans le sol dans les champs.

Rhodococcus equi virulent isolé		Dans le sol	
		OUI	NON
Dans l'air	OUI	0	2 <i>1 atteint</i> <i>1 témoin</i>
	NON	6 <i>1 témoin</i> <i>2 sporadiques</i> <i>3 atteints</i>	3 <i>1 témoin</i> <i>2 atteints</i>

Au vu du faible nombre de mesures dans les haras témoins (dans 2 haras sur 3 seulement) et du nombre de haras visités, il n'apparaît aucun lien entre l'humidité et le pH du sol dans le champ et dans le paddock et l'isolement de *Rhodococcus equi* virulent ou non dans l'air et dans le sol.

CONCLUSION

La réalisation de l'étude dans dix haras nous a permis de vérifier la sécurité et d'ajuster la mise en pratique de la méthode de prélèvement des bactéries dans l'air mise au point en 2011. Nous avons pu constituer, parmi les élevages reconnus les plus à risque de présenter des cas de rhodococcose pulmonaire en Basse-Normandie (plus de 15 naissances par an) un lot de haras témoins et un lot de haras atteints comparables du point de vue de leur organisation et de leur composition. Du point de vue de la composition des haras, la seule différence significative est la densité des poulains, plus élevée dans les haras atteints que dans les haras témoins ($p=0,012$).

La quantité de poussières et donc de bactéries dans l'air pouvant être très fortement influencée par la météo des jours précédant le prélèvement et du jour du prélèvement, nous avons défini des critères météorologiques afin d'encadrer les jours de prélèvements. Le climat relativement pluvieux pendant l'été 2012 où nous avons réalisé l'étude a largement affecté le nombre de haras que nous avons pu visiter (10 sur les 28 prévus initialement). Cependant l'étude *a posteriori* des conditions climatiques lors des prélèvements montre que nos critères nous ont permis de nous déplacer dans des conditions similaires dans les haras témoins et les haras atteints, ce qui nous autorise à comparer la concentration de *Rhodococcus equi* prélevés dans l'air entre ces deux lots. Nous notons toutefois que la vitesse du vent est plus élevée dans les paddocks des haras atteints que dans les paddocks des haras sains, ce qui pourrait expliquer la présence d'infections dans les premiers.

La quantité de *Rhodococcus equi* isolée à partir des prélèvements d'air nous a paru faible par rapport aux données publiées avec d'autres techniques de prélèvement. Nous avons donc expérimentalement évalué l'influence du fonctionnement de notre appareil de mesure (le CIP10 M) sur la viabilité de la bactérie. Nous nous sommes alors rendus compte que la survie de *Rhodococcus equi* est faible (26 % de la quantité initiale introduite) après 90 minutes de prélèvement. Le passage de l'air entraîne une évaporation du liquide de prélèvement, la courbe de survie de *Rhodococcus equi* en fonction du temps de prélèvement est très proche de la courbe d'évaporation du liquide de prélèvement. Nous pensons que l'évaporation du liquide a entraîné sa concentration en nutriments qui a pu conduire à créer un environnement hyper-osmotique non adapté à la survie de *Rhodococcus equi*. Des investigations supplémentaires sont à mettre en place avant de reproduire notre technique de prélèvement d'air, afin d'adapter celle-ci.

Dans les haras déjà étudiés en 2011, les résultats de l'isolement dans l'air de *Rhodococcus equi* sont comparables entre 2011 et 2012, ce qui tend à renforcer le fait que notre technique de prélèvement malgré ses imperfections est répétable d'une année sur l'autre pour un haras donné. En 2012, nous avons retrouvé peu de *Rhodococcus equi* dans l'air et sur le sol du box. Tous les boxes dans lesquels nous avons réalisé nos prélèvements étaient propres au moment de notre passage, il nous semble donc que dans les haras « professionnels » que nous avons étudiés, le box n'est pas un lieu important de contamination des poulains. Dans les champs, les résultats d'isolement dans l'air sont incohérents avec le statut des haras puisque nous n'avons retrouvé *Rhodococcus equi* virulent que dans les champs de haras témoins. Enfin dans les paddocks, *Rhodococcus equi* virulent n'a été

retrouvé dans l'air et dans le sol en même temps que dans deux haras atteints. Des souches virulentes de la bactérie ont été retrouvées sur le sol de 5 haras atteints sur les six visités.

Il semblerait que dans les élevages étudiés, la zone la plus à risque pour l'infection des poulains soit le paddock. Nous avons retrouvé peu de corrélation entre les isollements dans l'air et les isollements dans le sol et cela est probablement dû à un ajustement nécessaire de notre technique de prélèvements dans l'air.

Bibliographie

- BENOIT S., BENACHOUR A., TAOUI S., AUFRAY Y., HARTKE A. (2002). H₂O₂, which causes macrophage-related stress triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, **70**(7), 3768-3776.
- BURTON A., GIGUERE S., STURGILL T., BERGHAUS L., SLOVIS N., WHITMAN J., *et al.* (2012). Emergence of widespread macrolide and rifampin resistance in *Rhodococcus equi* isolates from a horse breeding farm. *5th Havenmeyer workshop on Rhodococcus equi*, (p. 30). Deauville.
- CAUCHARD J., SEVI C., BALLEST J., & TAOUI S. (2004). Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Veterinary Microbiology*, **104**, 73-81.
- CHAFFIN K. *et al.* (2003b). Evaluation of equine breeding farm characteristics as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **222**, 467-475.
- CHAFFIN K. *et al.* (2003a). Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia on farms with endemic infection. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **223**, 1791-1799.
- CHIRINO-TREJO J., PRESCOTT J., YAGER J. (1987). Protection of foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **51**(4), 444-447.
- COHEN N. *et al.* (2005). Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **226**, 404-413.
- COHEN N. *et al.* (2008). Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. *American Journal of Veterinary Research*, **69**, 385-395.
- DAWSON T., HOROHOV D., MEIJER W., & MUSCATELLO G. (2010). Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **135**, 1-11.
- EUZEBY, J. (2002, Janvier 18). *RHODOCOCCUS, RHODOCOCCUS EQUI*. Consulté le Juin 15, 2012, sur Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire:
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/rr/rhodococcus.html>
- FERNANDEZ-MORA E., POLIDORI M., LÜHRMANN A., SCHAIBLE U., HAAS A. (2005). Maturation of *Rhodococcus equi*-containing vacuole is arrested after completion of the early endosome stage. *Traffic*, **6**, 635-653.

- GIGUERE S., PRESCOTT J. (1997). Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Microbiology*, **56**, 313-334.
- GIGUERE S., WILKIE B., PRESCOTT J. (1999). Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, **67**(10), 5041-5047.
- GÖRNER P., FABRIES J., DUQUENNE P., WITSVHGER O., WROBEL R. (2006). Bioaerosol sampling by a personal rotating cup sampler CIP 10-M. *Journal of Environmental Monitoring*, **8**, 43-48.
- GRIMM M., COHEN N., SLOVIS N., MUNDY G., HARRINGTON J., LIBAL M., *et al.* (2007). Evaluation of fecal samples from mares as a source of *Rhodococcus equi* for their foal by use of a quantitative bacteriologic culture and colony immunoblot analyses. *American Journal of Veterinary Research*, **68**, 63-71.
- HUGHES K., SULAIMAN I. (1987). The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. *Veterinary Microbiology*, **14**, 241 - 250.
- JACKS S., GIGUERE S. (2010). Effect of inoculum size on cell-mediated and humoral immune responses of foals experimentally infected with *Rhodococcus equi* : A pilot study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **133**, 282-286.
- LETEK M., GONZALES P., MACARTHUR I., RODRIGUEZ H., FREEMAN T., VALERO-RELLO A., *et al.* (2010). The genome of a pathogenic *Rhodococcus*. cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genetics*, **6**(9).
- MACARTHUR I., GONZALEZ P., VALERO-RELLO A., PRESCOTT J., VASQUEZ-BOLAND J. (2012). Polysaccharide capsule and *Rhodococcus equi* virulence. *5th Havenmayer Workshop on Rhodococcus equi, Deauville Juillet 2012*.
- MAINELIS G., MAOSHENG Y. (2004). Evaluation of a high-volume portable bioaerosol sampler in laboratory and fields environments. *Indoor Air*, **6**(14), 385-393.
- MARTENS R., COHEN N., CHAFFIN M., WAKSOM J. (2002, Janvier). Association of pneumonia in foals caused by *Rhodococcus equi* with farm soil geochemistry. *American Journal of Veterinary Research*, **63**, 95-98.
- MARTENS R., TAKAI S., COHEN N., CHAFFIN M., LIU H., SAKURAI K., *et al.* (2000). Association of disease with isolation and virulence of *Rhodococcus equi* from farm soil and foals pneumonia. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **217**(2), 220-225.
- MAUGER, C. (2009). *Etude rétrospective de la rhodococcose à partir d'une population de 1617 poulains autopsiés au laboratoire d'étude et de recherches en pathologie équine (AFSSA - Dozulé) de 1986 à 2006. Thèse pour le doctorat vétérinaire soutenue à l'ENVA.*
- MUSCATELLO, G. (2011 a). *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal - Part 1: Pathogenesis and epidemiology. *The Veterinary Journal*, **192**(1), 20-26.
- MUSCATELLO, G. (2011 b). *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal - Part 2 : Diagnostics, treatment and disease management. *The Veterinary Journal*, **192**(1), 27-33.

- MUSCATELLO G., ANDERSON G., GILKERSON J., BROWNING G. (2006). Associations between the Ecology of Virulent *Rhodococcus equi* and the Epidemiology of *R. equi* Pneumonia on Australian Thoroughbred Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(9), pp. 6152 - 6160.
- MUSCATELLO G., GERBAUD S., KENNEDY C., GILKERSON J., BUCKLEY T., KLAY M., *et al.* (2006). 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 Veterinary Journal*, **38**, 263-265.
- MUSCATELLO, G., LEADON, D., KLAY, M., OCAMPO-SOSA, A., LEWIS, D., FOGARTY, U., *et al.* (2007). *Rhodococcus equi* infection in foals : the science of 'rattles'. *Equine Veterinary Journal*, **39**(5), 470-478.
- PEI Y., DUPONT C., SYDOR T., HAAS A., PRESCOTT J. (2006). Cholesterol oxidase (ChoE) is not important in the virulence of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, **118**(3-4), 240-246.
- PHILIPOT D. (2012). Mise au point d'une technique de quantification de *Rhodococcus equi* dans l'air. *Thèse pour le doctorat vétérinaire soutenue à l'ENVA*.
- PRESCOTT J. (1981). Capsular Serotypes of *Corynebacterium equi*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **45**, 130-134.
- REN J., PRESCOTT, J. (2003). Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* AATCC 33701. *Veterinary Microbiology*, **94**, 167-182.
- REUSS S., CHAFFIN M., COHEN N. (2009). Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infections in foals : 150 cases (1987 - 2007). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **235**, 855-863.
- SYDOR T., VON BARGEN K., BECKEN U., SPURCK S., NICHOLSON V., PRESCOTT J., *et al.* (2008). A mycolyl transferase mutant of *Rhodococcus equi* lacking capsule integrity is fully virulent. *Veterinary Microbiology*, **128**(3-4), 327-341.
- TAKAI, S. (1997). Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections : A review. *Veterinary Microbiology*, **56**, 167-176.
- TAKAI S., HINES S., SEKIKAZI T., NICHOLSON V., ALPERIN D., OSAKI M., *et al.* (2000). DNA sequence and comparison of virulence plasmid from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infection and Immunity*, **68**(12), 6840-6847.
- TAKAI S. *et al.* (1986 a). Quantitative aspects of Fecal *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in Foals. *Journal of Clinical Microbiology*, **23**(4), 794-796.
- TAKAI S., KAZUKO N., KIMIKO A., SHIRO T. (1986 b). Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in soil on a horse-breeding farm. *Veterinary Microbiology*, **12**, 169-177.
- TAKAI S., SASAKI Y., TSUBAKI S. (1995). *Rhodococcus equi* infection in foals - Current concepts and Implication for Future Research -. *Journal of Equine Science*, **6**(4), 105 - 119.

- TAPPREST J. *et al.* (2012). Pulmonary rhodococcosis in foals: risk factors related to horse husbandry in France. *Revue de Médecine Vétérinaire de Toulouse*, **162**(12), 563-573.
- VENNER M., ROEDIGER A., ASTHEIMER K., LAEMMER M., GIGUERE S. (2012). Antimicrobial therapy of foals with subclinical ultrasonographic lesions : Are we doing the right thing? *5th Havenmeyer Workshop on Rhodococcus equi*, (p. 36). Deauville.
- WADA R., KAMADA M., ANZAI T., NAKANISHI A., KANEMARU T., TAKAI S., *et al.* (1997). Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. *Veterinary Microbiology*, **56**, 301-312.
- WEINSOCK D., ARTHUR B. (2002). *Rhodococcus equi*: An Emerging Pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, **34**(10), 1379-1385.

Annexe 1 : Guide pour les appels aux éleveurs

RHODOCOCLOSE 2012

Appel éleveur

1. Présentation objectifs de l'étude
IPC, unité épidémiologie et anatomie pathologique, nous menons une étude afin de
« **quantifier la bactérie *Rhodococcus equi* dans l'environnement des poulains, nous souhaiterions inclure votre élevage dans notre programme de prélèvements. Avez-vous quelques instants à nous accorder pour que nous vous présentions l'étude ?** »
2. Matériel et méthode :
Recherche de la bactérie dans l'environnement de vie des poulains (air et sol), dans l'air et dans le sol, au moyen de :
 - a. Récolte d'échantillons de terre dans un champ et un paddock et recherche de la bactérie sur le sol du box ;
 - b. « **Récolte d'air à l'aide d'un petit appareil silencieux fixé sur le licol de la mère, suivant une méthode testée dans deux haras l'année dernière.** »
3. Investissement pour l'éleveur
Une journée (« **date fixée en accord avec vous bien sûr** ») pendant laquelle nous venons faire nos mesures et remplir un court questionnaire. « **Nous avons besoin de votre concours pour choisir la jument qui portera le dispositif et nous aider à le fixer à son licol ; ainsi que pour le choix du champ et du paddock à prélever.** »
4. Intérêt pour l'éleveur :
« **Résultats anonymes garantis par le laboratoire** ». Nous vous communiquerons les résultats globaux de l'étude avec une présentation personnalisée pour votre élevage ; en particulier si nous retrouvons d'autres germes pathogènes que *R. equi* dans l'environnement.
5. Acceptez-vous de participer à l'étude que nous vous présentons ? OUI / NON

6. Vérifier coordonnées de l'éleveur :

NOM et prénom : _____

NOM de l'élevage : _____

ADRESSE : _____

TEL (fixe ou mobile) afin de fixer le rdv : ____ _

Mel : _____ @ _____

7. Nous vous faisons parvenir un courrier résumant le déroulement de notre étude, ainsi qu'une demande d'accord pour venir dans votre haras.

Annexe 2 : Courrier envoyé aux éleveurs après leur accord de principe lors du contact téléphonique

ANSES – Dozulé
Institut de Pathologie du Cheval
Unité Epidémiologie et anatomie pathologique
14 430 GOUSTRANVILLE
Tel : 02 31 79 79 58

Madame, Monsieur,

Suite à notre appel téléphonique, nous vous faisons parvenir un résumé du déroulement de l'étude Rhodococcose 2012 que nous souhaitons réaliser. Depuis de nombreuses années, notre laboratoire s'investit pour améliorer les connaissances scientifiques sur cette maladie qui cause des pertes importantes tant économiques que sportives, dans les élevages bas-normands.

Notre étude de 2005 auprès des vétérinaires et des éleveurs montre qu'un environnement poussiéreux est le facteur de risque principal de l'apparition de la maladie chez les poulains (les poulains se contaminent à partir de poussières transportant *Rhodococcus equi*). En 2011, nous avons mis au point une technique de quantification de la bactérie dans l'air que nous avons testée avec succès dans deux haras.

Cet outil devrait permettre de préciser l'existence de zones à risque et d'aider à la prévention de la maladie.

Cette année, nous souhaitons valider cet outil plus à grande échelle par la réalisation de mesures dans 28 haras (des haras témoins et des haras présentant des cas de rhodococcose). Si vous acceptez de participer à ce projet, il s'agirait de nous permettre de réaliser des mesures dans votre élevage pendant une journée et de répondre à un questionnaire d'une durée inférieure à 20 minutes.

Les mesures réalisées dans votre élevage comprendraient:

- Récolte de l'air ambiant à l'aide d'un appareil fixé au licol d'une jument suitée suivant la technique mise au point par notre laboratoire l'année dernière. Ces mesures seront réalisées dans un paddock et un champ accueillant régulièrement des couples mère-poulains.
- Récolte de l'air dans un box en présence d'une jument suitée.
- Récolte d'échantillons de terre en surface et à 5 cm de profondeur dans le champ et dans le paddock.
- Récolte des micro-organismes de la surface du sol dans le même box.

L'ensemble de ces prélèvements sont conçus pour être non invasifs pour les animaux, et perturber le moins possible le fonctionnement de votre élevage. Cependant nous aurons besoin de votre participation pour le choix de la jument suitée et les phases de fixation et retrait de l'appareil sur le licol de cette jument.

Les données de cette étude seront centralisées et traitées à l'ANSES de Dozulé avec engagement de confidentialité.

Si vous êtes volontaire pour participer tous les résultats des mesures vous concernant vous seront bien sûr communiqués (ainsi qu'à votre vétérinaire traitant après accord de votre part), ainsi que les résultats globaux de l'étude.

Nous restons à votre entière disposition si vous avez des questions supplémentaires sur le déroulement de cette étude.

Annexe 3 : Formulaire envoyé aux éleveurs en même temps que le courrier afin de compléter les informations concernant le statut du haras et d'organiser le jour de notre visite ENQUÊTE RHODOCOCOSE 2012

La campagne de prélèvements se déroulera entre le 14 mai et le 27 juillet. Cependant, les prélèvements d'air ne peuvent être réalisés que par temps sec, ce qui ne nous permet pas de définir un planning longtemps à l'avance.

Afin d'organiser au mieux notre visite merci de compléter le formulaire ci-dessous.

NOM et prénom : _____

NOM de l'élevage : _____

ADRESSE : _____

TEL (fixe ou mobile) afin de fixer le rdv : __ __ __ __ __

RACE(S) élevée(s) : _____

Coordonnées de votre vétérinaire traitant : _____

Acceptez-vous que nous contactions votre vétérinaire à la fin de la saison pour avoir des précisions sur les éventuels cas de pneumonies qui seront apparus ?

☐ OUI

☐ NON

Nombre de naissances en 2011 : _____ ; prévision 2012 : _____

ACCEPTEZ-VOUS DE PARTICIPER A L'ETUDE RHODOCOCOSE 2012 ?

☐ OUI

☐ NON

VOTRE ELEVAGE A-T-IL ETE ATTEINT DE CAS DE RHODOCOCOSE DANS LES 3 DERNIERES ANNEES ?

☐ OUI

☐ NON

Afin de prévoir au mieux notre venue dans votre élevage :

- Merci de rayer les semaines où vous n'êtes pas disponible :

L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D
MAI							JUIN							JUILLET						
	1	2	3	4	5	6					1	2	3	2	3	4	5	6	7	8
7	8	9	10	11	12	13	4	5	6	7	8	9	10	9	10	11	12	13	14	15
14	15	16	17	18	19	20	11	12	13	14	15	16	17	16	17	18	19	20	21	22
21	22	23	24	25	26	27	18	19	20	21	22	23	24	23	24	25	26	27	28	29
28	29	30	31				25	26	27	28	29	30		30	31					

- Merci de nous indiquer les jours de la semaine ou vous souhaitez que nous ne passions pas (suivi de reproduction, entraînements...)

☐ **Lu**

☐ **Ma**

☐ **Me**

☐ **Je**

☐ **Ve**

Date et Signature :

Annexe 4 : Guide pour les appels aux vétérinaires traitants

RHODOCOCLOSE 2012

Appel vétérinaire

Coordonnées de la clinique :

Présentation objectifs de l'étude

- a. Anses-Dozulé **service épidémiologie et anatomie pathologique** nous réalisons une **étude de terrain sur la quantification de *R equi* dans l'environnement des poulains**, Parmi les haras sélectionnés, il y en a XX haras pour lesquels vous nous avez envoyé des demandes d'autopsie → *Pouvez-vous m'indiquer si vous êtes toujours le vétérinaire traitant pour les haras suivants?*
- b. **Au premier oui**, enchaîner avec accord pour déplacement dans cet élevage « **Avant de les contacter nous souhaitons savoir si vous voyez un inconvénient à ce que nous demandions à cet élevage de participer à notre étude.** » puis sur statut *a priori* « **cet élevage a-t-il présenté des cas de rhodococcose ces dernières années ?** »
- c. 1 journée de prélèvements dans chaque haras avec récolte de l'air par un appareil fixé sur le licol d'une jument suivie sur jument + prélèvements de surfaces à différents endroits du haras.

N°	Nom_elevage	Tjs_véto_traitant ?	Accord_véto	Statut <i>a priori</i>
1		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO
2		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO
3		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO
4		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO
5		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO
6		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO
7		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO
8		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO
9		OUI / NON	OUI / NON	TEMOIN / RHODO

? « **avez-vous dans votre clientèle d'autres haras de plus de 15 naissances par an qui ont des cas fréquents de rhodococcose ?** »

NB : Tous les élevages cités ne seront pas forcément appelés dans un premier temps, cela dépendra de leur ordre déterminé par tirage au sort.

Nous vous remercions, et vous faisons parvenir un courrier résumant les objectifs de notre étude.

Annexe 5 : Courrier envoyé aux vétérinaires après le contact téléphonique pour compléter les informations sur les élevages de leur clientèle

ANSES – Dozulé
Institut de Pathologie du Cheval
Unité Epidémiologie et anatomie pathologique
14 430 GOUSTRANVILLE

Chère consœur, cher confrère,

Suite à notre appel téléphonique nous vous faisons parvenir un résumé du déroulement de l'étude Rhodococcose 2012 que nous souhaitons réaliser. Depuis de nombreuses années, notre laboratoire s'investit pour améliorer les connaissances scientifiques sur cette maladie qui cause des pertes importantes tant économiques que sportives dans les élevages bas-normands.

En 2005, une étude à l'échelle régionale a montré que les facteurs de risques principaux associés au développement de la maladie étaient un nombre de naissances annuelles supérieur à 15 et un environnement poussiéreux des poulains. En 2010 et 2011, nous avons mis au point une technique de quantification de la bactérie dans l'air et nous l'avons testée avec succès dans deux haras.

Cet outil devrait permettre de déterminer l'existence de zones à risque et d'aider à la prévention de la maladie.

Cette année, nous souhaitons valider cet outil plus à grande échelle par la réalisation de mesures dans 28 haras (des haras témoins et des haras présentant des cas de rhodococcose). A cet effet, nous avons constitué deux listes d'élevages de plus de 15 naissances (témoins et atteints) à partir de la base SIRE et de la base de données des autopsies.

Par tirage au sort, nous avons retenu l'élevage ... en tant qu'élevage sain/atteint, pour lequel vous avez adressé une ou plusieurs demande d'autopsie à notre laboratoire. Nous vous remercions d'avoir accepté que nous contactions cet élevage pour lui proposer de participer à notre enquête. Si ce dernier répond favorablement, nous vous recontacterons en fin de saison pour affiner nos informations sur l'état sanitaire de l'élevage et vous faire part des résultats de l'étude.

Dans les élevages qui accepteront de participer, nous réaliserons une série de mesures de quantification de la bactérie dans l'air (appareil porté par une jument suitée) et dans le sol ; et nous remplirons un court questionnaire avec l'éleveur afin d'obtenir des informations sur le statut de l'élevage par rapport aux facteurs de risques décrits comme favorisant l'apparition de la maladie (taille de l'élevage, présence d'animaux en transit...).

Les données de cette étude seront centralisées et traitées à l'ANSES de Dozulé avec engagement de confidentialité.

En vous remerciant par avance pour votre attention.

**Annexe 6 : Questionnaire envoyé aux vétérinaires en même temps que
le courrier précédent**

ENQUÊTE RHODOCOCLOSE 2012

Merci de nous retourner cette fiche complétée avec l'enveloppe jointe

NOM et prénom : _____

ADRESSE : _____

TEL : __ _ - __ _ - __ _

Quels sont vos principaux critères diagnostiques pour conclure à un cas de rhodococcose ?

--

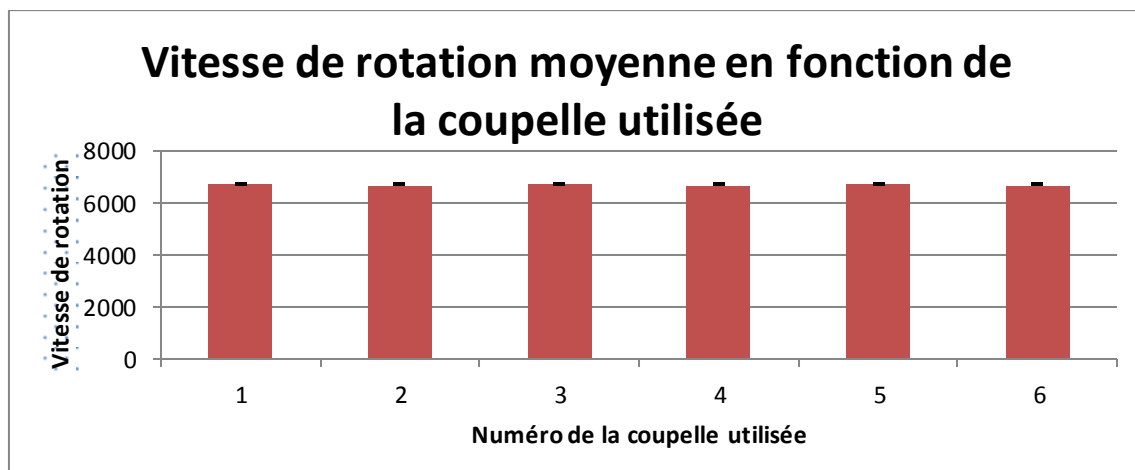
Nombre de poulains ayant développé une pneumonie à *Rhodococcus equi* (ou pneumonie avec très forte suspicion de rhodococcose) :

Elevage 1 :

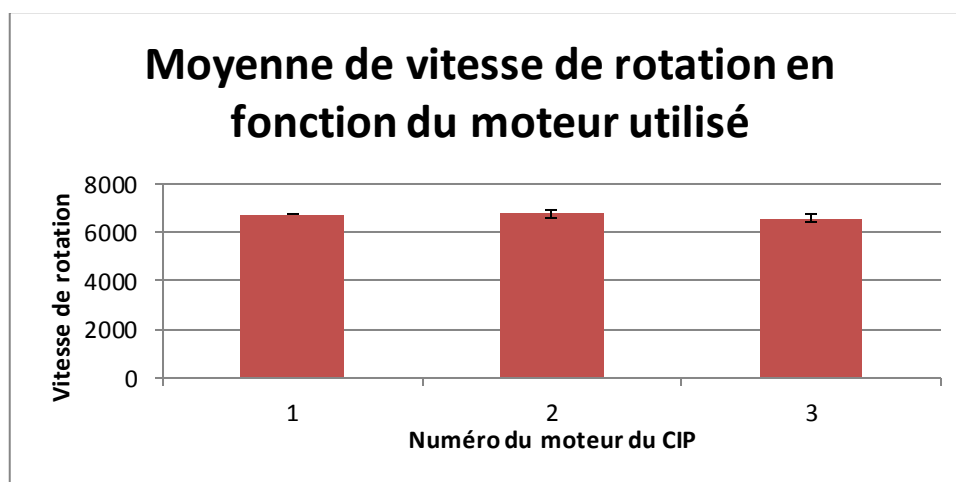
- En 2011 :
- En 2010 :
- En 2009 :

Annexe 7 : Etude de la variabilité de la vitesse de rotation des CIP en fonction de la coupelle utilisée

Sur chacune des 6 coupelles disponibles au laboratoire, nous avons fixé deux bandes réfléchissantes diamétralement opposées, sur le bord extérieur de la coupelle, afin de pouvoir déterminer sa vitesse de rotation à l'aide d'un tachymètre laser. Puis nous avons mesuré la vitesse de chacun des trois CIP apparié avec chaque coupelle disponible obtenue après stabilisation de la vitesse de rotation, en réalisant trois mesures distinctes à chaque fois.



Il n'y a pas de différence significative de vitesse de rotation en fonction de la coupelle utilisée (test de Wilcoxon).



Il n'y a pas de différence significative de vitesse de rotation en fonction du moteur utilisé (test de Wilcoxon). Nous avons donc choisi de suivre le fonctionnement des appareils au cours de la saison de prélèvements en utilisant toujours la même coupelle test, seule à garder les bandes réfléchissantes permettant la mesure à l'aide du tachymètre laser et utilisé les autres coupelles au hasard pour les prélèvements. Cette manipulation nous a aussi permis de nous rendre compte la vitesse de rotation de l'appareil diminue fortement si la coupelle n'est pas fermement emboîtée dans le moteur, ce qui entraîne une vibration de tout le dispositif ainsi qu'un bruit anormal lors de la mise en fonctionnement.

Annexe 8 : Description des variables utilisées

Nom du champ	type de données	Description
id_haras	Texte	Numéro de l'élevage
Statut	Texte	Statut de l'élevage au début de l'étude, lors du recrutement
Statut_modifié	Texte	Statut de l'élevage défini en fonction de l'historique des cas comprenant l'année 2012
date_visite	Texte	Date à laquelle les prélèvements ont été effectués
an_creation	Texte	Date de création du haras
date_intro_cv	Texte	Date depuis laquelle des chevaux sont présents sur les terres
race	Texte	Race de chevaux dans l'élevage
cas_2009	Numérique	Nombre de cas de rhodococcose pulmonaire sur des poulains en 2009
cas_2010	Numérique	Nombre de cas de rhodococcose pulmonaire sur des poulains en 2010
cas_2011	Numérique	Nombre de cas de rhodococcose pulmonaire sur des poulains en 2011
naiss_2011	Numérique	Nombre de poulains nés en 2011
prevalence_2011	Numérique	Prévalence de rhodococcose pulmonaire sur des poulains en 2011
cas_2012	Numérique	Nombre de cas de rhodococcose pulmonaire sur des poulains en 2012
diag_conforme	Texte	Evaluation de la pertinence des modalités diagnostiques décrites par l'éleveur
vacc_poulinières	Texte	Vaccination des poulinières contre <i>Rhodococcus equi</i>
vacc_poulains	Texte	Vaccination des poulains contre <i>Rhodococcus equi</i>
nb_cv	Numérique	Nombre de chevaux dans l'élevage
nb_poulinieres_res	Numérique	Nombre de poulinières présentes toute l'année dans l'élevage
nb_poulinieres_passage	Numérique	Nombre de poulinières de passage dans l'élevage
sth_cv	Numérique	Surface Totale en Herbe utilisée pour l'élevage des Chevaux
foals_res_2012	Numérique	Nombre de poulains nés en 2012 de poulinières résidentes
foal_passage_2012	Numérique	Nombre de poulains présents en 2012 nés d'une poulinière de passage
sth_foals	Numérique	Surface Totale en Herbe utilisée pour l'élevage des poulains
cap_accueil	Texte	Evaluation par l'éleveur du nombre de chevaux présents en fonction de ses capacités d'accueil
critere_limitant_accueil	Texte	Evaluation par l'éleveur du critère limitant le nombre de chevaux dans l'élevage
nb_etalons	Numérique	Nombre d'étalons présents dans l'élevage
nb_cv_>1an	Numérique	Nombre de chevaux de plus d'un an présents dans l'élevage
personnel	Numérique	Nombre d'UTH travaillant sur le haras
nb_cv/personnel	Numérique	Rapport entre le nombre de chevaux et le personnel présents dans l'élevage

Nom du champ	type de données	Description
poulinieres_exterieures	Binaire	Présence ou absence de poulinières de passage dans l'élevage
nb_poulinieres_ext	Numérique	Nombre de poulinières de passage dans l'élevage
melange	Binaire	Mélange ou non des poulinières de passage avec les animaux résidents
quarantaine	Numérique	Durée de la période de quarantaine
partage_soufflage	Binaire	Partage ou non de la barre de soufflage entre poulinières de passage et résidentes
partage_echographie	Binaire	Partage ou non de la barre d'échographie entre poulinières de passage et résidentes
partage_insemination	Binaire	Partage ou non de la barre d'insémination entre poulinières de passage et résidentes
partage_herbages	Binaire	Partage ou non des herbages entre poulinières de passage et résidentes
partage_paddock	Binaire	Partage ou non des paddocks entre poulinières de passage et résidentes
partage_vehicule	Binaire	Partage ou non des moyens de transport entre poulinières de passage et résidentes
logement_poulinieres	Texte	Type de logement de poulinières suitées
batiment_separe_poulains	Numérique	Distance approximative séparant le logement des poulinières suitées des autres bâtiments d'élevage
proximite_fumiere	Numérique	Distance approximative séparant le logement des poulinières de la fumière
salle_echographie	Binaire	Présence ou absence d'une salle d'échographie
salle_echo_propre	Binaire	Appréciation par les enquêteurs de la propreté de la salles d'échographie
aire_attente_echo_terre	Binaire	Présence ou absence d'une aire poussiéreuse devant la salle d'échographie
naiss_janv_fev	Numérique	Pourcentage de naissances en janvier et février
naiss_mars_avril	Numérique	Pourcentage de naissances en mars et avril
Nom du champ	type de données	Description
naiss_mai_juin	Numérique	Pourcentage de naissances en mai et juin
naiss_juillet_aout	Numérique	Pourcentage de naissances en juillet et Août
ctrl_qualite_colostrum	Binaire	Le dosage des IgG dans le colostrum est-il réalisé régulièrement?
dosage_Ig	Binaire	Le dosage des IgG dans le sang des poulains est-il réalisé régulièrement?
env_poulains_poussiereux	Binaire	Appréciation par les enquêteurs de la qualité de l'environnement des poulains

Nom du champ	type de données	Description
surf_champ	Numérique	Surface du champ utilisé pour les prélèvements
chargement_max_champ	Numérique	Nombre maximal de poulinières suitées présentes simultanément dans le champ
repos_champ	Binaire	Amménagement d'une période sans animaux pour le champ
vent_champ	Numérique	Vitesse du vent mesurée dans le champ au moment du prélèvement d'air
temperature_champ	Numérique	Température de l'air relevée dans le champ pendant le prélèvement d'air
humidite_champ	Numérique	Humidité relative de l'air relevée pendant le prélèvement d'air
note_poussiere_champ	Numérique	Évaluation de la quantité de poussières dans le champ (note de A à D)
chargement_champ	Numérique	Nombre de poulinières suitées présentes sur le champ durant le prélèvement d'air
proportion_terre_champ	Numérique	Pourcentage de la surface du champ en terre
proportion_herbe_champ	Numérique	Pourcentage de la surface du champ en herbe
nb_aires_sans_herbe_champ	Numérique	Nombre d'aires sans herbes dans le champ
cip_utilise_champ	Numérique	Numéro du moteur de CIP utilisé pour le prélèvement d'air dans le champ
tachymetre_debut_champ	Numérique	Vitesse de rotation de la coupelle du CIP avant le prélèvement d'air dans le champ
debut_prlvmt_air_champ	Numérique	Heure de début du prélèvement d'air dans le champ
tachymetre_fin_champ	Numérique	Vitesse de rotation de la coupelle du CIP après le prélèvement d'air dans le champ
fin_prlvmt_air_herbage	Numérique	Heure de fin de prélèvement d'air dans le champ
pH_terre_champ	Numérique	pH de la terre du champ
humidite_terre_champ	Numérique	Humidité de la terre du champ
volume_cip_champ	Numérique	Volume de BHI restant dans la coupelle du CIP après le prélèvement d'air dans le champ
concentration_requi_air_p+_champ	Numérique	Concentration en UFC/m3 d'air de R equi virulent dans l'air du champ
concentration_requi_air_p-_champ	Numérique	Concentration en UFC/m3 d'air de R equi non virulent dans l'air du champ
concentration_requi_p+_terre_champ_entree_0cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre en surface à l'entrée du champ
concentration_requi_p+_terre_champ_entree_5cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre à 5cm à l'entrée du champ
concentration_requi_p+_terre_champ_abreuvoir_0cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre en surface à proximité de l'abreuvoir
concentration_requi_p+_terre_champ_abreuvoir_5cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre à 5cm à proximité de l'abreuvoir
concentration_requi_p+_terre_champ_centre_0cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre en surface au centre du champ
concentration_requi_p+_terre_champ_centre_5cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre à 5cm au centre du champ
concentration_requi_p-_terre_champ_entree_0cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre en surface à l'entrée du champ
concentration_requi_p-_terre_champ_entree_5cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre à 5cm à l'entrée du champ
concentration_requi_p-_terre_champ_abreuvoir_0cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre en surface à proximité de l'abreuvoir
concentration_requi_p-_terre_champ_abreuvoir_5cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre à 5cm à proximité de l'abreuvoir
concentration_requi_p-_terre_champ_centre_0cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre en surface au centre du champ
concentration_requi_p-_terre_champ_centre_5cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre à 5cm au centre du champ

Nom du champ	type de données	Description
surf_paddock	Numérique	Surface du paddock utilisé pour les prélèvements
chargement_max_paddock	Numérique	Nombre maximal de poulinières suitées présentes simultanément dans le paddock
repos_paddock	Binaire	Amménagement d'une période sans animaux pour le paddock
vent_paddock	Numérique	Vitesse du vent mesurée dans le paddock au moment du prélèvement d'air
temperature_paddock	Numérique	Température de l'air relevée dans le paddock pendant le prélèvement d'air
humidite_paddock	Numérique	Humidité relative de l'air relevée pendant le prélèvement d'air dans le paddock
note_poussiere_paddock	Numérique	Évaluation de la quantité de poussières dans le paddock (note de A à D)
chargement_paddock	Numérique	Nombre de poulinières suitées présentes sur le paddock durant le prélèvement d'air
proportion_terre_paddock	Numérique	Pourcentage de la surface du paddock en terre
proportion_herbe_paddock	Numérique	Pourcentage de la surface du paddock en herbe
nb_aires_sans_herbe_paddock	Numérique	Nombre d'aires sans herbes dans le paddock
cip_utilise_paddock	Numérique	Numéro du moteur de CIP utilisé pour le prélèvement d'air dans le paddock
tachymetre_debut_paddock	Numérique	Vitesse de rotation de la coupelle du CIP avant le prélèvement d'air dans le paddock
debut_prlvmt_air_paddock	Numérique	Heure de début du prélèvement d'air dans le paddock
tachymetre_fin_paddock	Numérique	Vitesse de rotation de la coupelle du CIP après le prélèvement d'air dans le paddock
fin_prlvmt_air_paddock	Numérique	Heure de fin de prélèvement d'air dans le paddock
pH_terre_paddock	Numérique	pH de la terre du paddock
Humidite_terre_paddock	Numérique	Humidité de la terre du paddock
volume_cip_paddock	Numérique	Volume de BHI restant dans la coupelle du CIP après le prélèvement d'air dans le paddock
concentration_requi_air_p+_paddock	Numérique	Concentration en UFC/m3 d'air de R equi virulent dans l'air du paddock
concentration_requi_air_p-_paddock	Numérique	Concentration en UFC/m3 d'air de R equi non virulent dans l'air du paddock
concentration_requi_p+_terre_paddock_entree_0cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre en surface à l'entrée du paddock
concentration_requi_p+_terre_paddock_entree_5cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre à 5cm à l'entrée du paddock
concentration_requi_p+_terre_paddock_abreuvoir_0cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre en surface à proximité de l'abreuvoir
concentration_requi_p+_terre_paddock_abreuvoir_5cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre à 5cm à proximité de l'abreuvoir
concentration_requi_p+_terre_paddock_centre_0cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre en surface au centre du paddock
concentration_requi_p+_terre_paddock_centre_5cm	Numérique	Concentration de R equi virulent dans la terre à 5cm au centre du paddock
concentration_requi_p-_terre_paddock_entree_0cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre en surface à l'entrée du paddock
concentration_requi_p-_terre_paddock_entree_5cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre à 5cm à l'entrée du paddock
concentration_requi_p-_terre_paddock_abreuvoir_0cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre en surface à proximité de l'abreuvoir
concentration_requi_p-_terre_paddock_abreuvoir_5cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre à 5cm à proximité de l'abreuvoir
concentration_requi_p-_terre_paddock_centre_0cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre en surface au centre du paddock
concentration_requi_p-_terre_paddock_centre_5cm	Numérique	Concentration de R equi non virulent dans la terre à 5cm au centre du paddock

Nom du champ	type de données	Description
surf_box	Numérique	Surface du box utilisé pour les prélèvements
fq_retrait_crottins	Numérique	Durée en jours entre deux retraits de crottins dans le box
vent_box	Numérique	Vitesse du vent mesurée dans le box pendant le prélèvement d'air
temperature_box	Numérique	Température de l'air relevée pendant le prélèvement d'air dans le box
humidite_box	Numérique	Humidité relative de l'air dans le box pendant le prélèvement d'air
type_sol_box	Texte	Composition du sol du box
type_litiere_box	Texte	Type de litière utilisée dans le box
proprete_litiere_box	Texte	Evaluation de la propreté de la litière dans le box pendant le prélèvement d'air
ventilation_box	Texte	Evaluation de la ventilation du box
cip_entree_box	Numérique	Numéro du moteur de CIP utilisé pour le prélèvement d'air à l'entrée du box
cip_fond_box	Numérique	Numéro du moteur de CIP utilisé pour le prélèvement d'air au fond du box
tachymetre_debut_box_entree	Numérique	Vitesse de rotation de la coupelle du CIP à l'entrée du box avant le prélèvement d'air
tachymetre_debut_box_fond	Numérique	Vitesse de rotation de la coupelle du CIP au fond du box avant le prélèvement d'air
debut_prlvmt_air_box	Numérique	Heure de début du prélèvement d'air dans le box
tachymetre_fin_box_entree	Numérique	Vitesse de rotation de la coupelle du CIP à l'entrée du box après le prélèvement d'air
tachymetre_fin_box_fond	Numérique	Vitesse de rotation de la coupelle du CIP au fond du box après le prélèvement d'air
fin_prlvmt_box	Numérique	Heure de fin de prélèvement d'air dans le box
volume_cip_box_entree	Numérique	Volume de BHI récupéré dans la coupelle du CIP à l'entrée du box en fin de prélèvement
volume_cip_box_fond	Numérique	Volume de BHI récupéré dans la coupelle du CIP au fond du box en fin de prélèvement
concentration_requi_air_p+_box_entree	Numérique	Concentration en UFC/m3 d'air de R equi virulent dans l'air de l'entrée du box
concentration_requi_air_p-_box_entree	Numérique	Concentration en UFC/m3 d'air de R equi non virulent dans l'air de l'entrée du box
concentration_requi_air_p+_box_fond	Numérique	Concentration en UFC/m3 d'air de R equi virulent dans l'air du fond du box
concentration_requi_air_p-_box_fond	Numérique	Concentration en UFC/m3 d'air de R equi non virulent dans l'air du fond du box
requi_p+_sol_box	Numérique	Concentration de R equi virulent sur le sol du box
requi_p-_sol_box	Numérique	Concentration de R equi non virulent sur le sol du box

Annexe 9 : Présentation des résultats : Questionnaire épidémiologique 1/2

id_haras	Statut	diag_conforme	vacc_poulinières	vacc_poulains	nb_cv	nb_poulinières_res	nb_poulinières_passage	sth_cv	foals_res_2012	foal_passage_2012	sth_foals
T0	TEMOIN	OUI	NON	NON	50	25	0	55	15	0	45
R0	ATTEINT	OUI	NON	NON	70	14	30	50	27	10	15
H1	ATTEINT	OUI	NON	NON	100	26	20	125	18	3	40
H2	ATTEINT	OUI	OUI	NON	200	70	40	120	55	25	120
H3	ATTEINT	OUI	NON	NON	70	24	0	72	25	0	40
H4	SPORAD	OUI	NON	NON	160	25	0	150	20	0	100
H5	TEMOIN	OUI	NON	NON	90	35	5	120	22	13	120
H6	TEMOIN	OUI	NON	NON	150	15	50	38	12	40	10
H7	SPORAD	OUI	NON	OUI	220	45	15	110	33	8	60
H8	ATTEINT	OUI	OUI	NON	65	25	0	85	24	0	20
H9	ATTEINT	OUI	NON	NON	70	14	30	50	27	10	15
H10	ATTEINT	OUI	NON	OUI	80	40	10	70	24	10	70

id_haras	Statut	cap_accueil	critere_limitant_accueil	nb_etallons	nb_cv_>1an	personnel	nb_cv/personnel	poulinières_extérieures	nb_poulinières_ext	melange
T0	TEMOIN	ATTEINTE	HERBAGES	0	39	6	8,33333333	0	0	0
R0	ATTEINT	ATTEINTE	MAIN ŒUVRE	3	30	4	17,5	OUI	30	NON
H1	ATTEINT	NON ATTEINTE	BOXES	5	50	9	11,11111111	OUI	20	OUI
H2	ATTEINT	ATTEINTE	TOUS	1	80	5	40	OUI	40	OUI
H3	ATTEINT	ATTEINTE	HERBAGES	0	40	5	14	NON	0	NON
H4	SPORAD	NON ATTEINTE	MAIN D'ŒUVRE	5	50	2	80	OUI	99	NON
H5	TEMOIN	NON ATTEINTE		1	40	6	15	OUI	13	OUI
H6	TEMOIN	ATTEINTE	HERBAGES	4		3	50	OUI	150	NON
H7	SPORAD	DEPASSEE	HERBAGE	2	110	9	24,44444444	OUI	15	OUI
H8	ATTEINT	DEPASSEE	BOXES	1	30	6	10,83333333	NON	0	NON
H9	ATTEINT	ATTEINTE	MAIN ŒUVRE	3	30	4	17,5	OUI	30	NON
H10	ATTEINT	ATTEINTE	BOXES	0	30	3	26,66666667	OUI	10	OUI

Annexe 10 : Présentation des résultats : Questionnaire épidémiologique 2/2.

id_haras	Statut	quarantaine	partage_soufflage	partage_ecogographie	partage_insemination	partage_herbages	partage_paddock	partage_vehicule	logement_poulinieres	batiment_separe_poulains	proximite_fumiere	salle_echoographie
T0	TEMOIN	0							BOXES	OUI	50	NON
R0	ATTEINT	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	BOXES	OUI	NON	OUI
H1	ATTEINT	21	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	BOXES	OUI	100	OUI
H2	ATTEINT	NON	ABSENT	OUI	OUI	OUI	NON	OUI	BOXES	OUI	50	OUI
H3	ATTEINT	15	NON	NON	NON	NON	NON	NON	BOXES	OUI	500	OUI
H4	SPORAD	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	NON	BOXES	OUI	0	OUI
H5	TEMOIN	15		NON		OUI	OUI	OUI	BOX/STABU	OUI	500	NON
H6	TEMOIN	NON		OUI	OUI	NON	NON	OUI	BOXES	NON	50	OUI
H7	SPORAD	NON	OUI	SO	SO	OUI	OUI	NON	BOXES	100	500	NON
H8	ATTEINT	SO	NON	NON	NON	NON	NON	NON	BOXES	75	50	OUI
H9	ATTEINT	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	BOXES	OUI	NON	OUI
H10	ATTEINT	NON	OUI	OUI	--	OUI	OUI	OUI	BOXES	OUI	80	OUI

id_haras	Statut	salle_echo_propre	aire_attente_echo_terre	naiss_jan_v_fev	naiss_mars_avril	naiss_mai_juin	naiss_juillet_aout	ctrl_qualite_colostrum	dosage_lg	env_poulains_poussiereux
T0	TEMOIN	0	0	50%	50%	0%	0%	OUI	OUI	NON
R0	ATTEINT	OUI	NON	25%	50			OUI	OUI	NON
H1	ATTEINT	OUI	NON	25%	65%	10%	0%	OUI	OUI	OUI
H2	ATTEINT	OUI	OUI	20%	60%	20%	0%	NON	NON	OUI
H3	ATTEINT	OUI	OUI	32%	52%	16%	0%	OUI	OUI	OUI
H4	SPORAD	OUI	NON	30%	70%	0%	0%	OUI	NON	OUI
H5	TEMOIN	NON	NON	32%	68%	0%	0%	OUI	OUI	OUI
H6	TEMOIN	OUI	NON					OUI	OUI	NON
H7	SPORAD	NON	OUI	30%	70%	0%	0%	OUI	NON	OUI
H8	ATTEINT	OUI	NON	62,50%	37,50%	0%	0%	OUI	NON	NON
H9	ATTEINT	OUI	NON	25%	50			OUI	OUI	NON
H10	ATTEINT	OUI	OUI	29,40%	61,80%	8,80%	0%	NON	OUI	OUI

Annexe 11 : Présentation des résultats : Caractéristiques des champs.

id_haras	Statut	surf_champ	chargement_max_champ	repos_champ	vent_champ	temperature_champ	humidite_champ	note_poussiere_champ	chargement_champ	proportion_terre_champ	proportion_herbe_champ
T0	TEMOIN	3	6	OUI	0,8	25,9°C	49,20%	A	200%	1%	99%
R0	ATTEINT	5	10	NON	2,5	26,0°C	55,40%	A	700%	3%	97%
H1	ATTEINT	6	15	OUI	0,8	20,2°C	66,40%	A	1300%	10%	90%
H2	ATTEINT	1,8	5	OUI	2,9	22	50%	A	400%	4%	96%
H3	ATTEINT	6	8	OUI	1,3	30,7	53%	A	600%	2%	98%
H4	SPORAD	4	4	OUI	3,5	21,5	55,60%	A	200%	0%	100%
H5	TEMOIN	2	5	OUI	1,1	24,2	39,80%	B	500%	5%	95%
H6	TEMOIN	5	15	OUI	0,4	25,5	51,20%	A	800%	2%	98%
H7	SPORAD	4,5	20	OUI	0,6	20,9	71%	A	500%	7%	93%
H8	ATTEINT	3	4	NON	0,7	34,5	40,50%	A	300%	1%	99%
H9	ATTEINT	5	10	NON	4,3	22,7	53,5	B	500%	2%	98%
H10	ATTEINT	4	6	OUI	1,5	21	63	B	400%	4%	96%

id_haras	Statut	nb_aires_sans_herbe_champ	cip_utilise_champ	tachymetre_debut_champ	debut_prlvmt_air_champ	tachymetre_fin_champ	fin_prlvmt_aire_herbages	pH_terre_champ	humidite_terre_champ	volume_cip_champ
T0	TEMOIN	2	2	13650	11:20	13860	12:50			0,45
R0	ATTEINT	3	3	12792	15:20	11850	16:50			1,5
H1	ATTEINT	2	1	11460	09:49	13501	11:19			1,5
H2	ATTEINT	5	2	13220	11:50	13565	13:22	7,1	17%	0,9
H3	ATTEINT	4	2	13618	12:49	13453	14:19	7,58	22,30%	0,6
H4	SPORAD	1	3	12830	12:18	13108	13:48	6,99	30,50%	0,9
H5	TEMOIN	4	1		12:15		13:45	6,86	24,10%	0,5
H6	TEMOIN	5	2	13460	09:55	13059	11:25	7,7	21,15%	0,8
H7	SPORAD	6	2	12737	10:00	12712	11:30	7,7	20,50%	0,2
H8	ATTEINT	2	1	13410	12:10	12864	13:40	7,5	23,15%	0,2
H9	ATTEINT	5	3	13699	11:52	12886	13:22	7,75	20,40%	0,5
H10	ATTEINT	3	1	13430	10:00	13460	11:30	7,65	21,75%	1

Annexe 12 : Présentation des résultats : Isolement de *Rhodococcus equi* dans les champs

id_haras	Statut	concentration_r equi_air _p+_ch amp	concentration_r equi_air _p- _champ	concentration_r equi_p+ _terre_c hamp_e ntree_0 cm	concentration_r equi_p+ _terre_c hamp_e ntree_5 cm	concentration_r equi_p+ _terre_c hamp_a breuvoir _0cm	concentration_r equi_p+ _terre_c hamp_a breuvoir _5cm	concentration_r equi_p+ _terre_c hamp_c entre_0 cm	concentration_r equi_p+ _terre_c hamp_c entre_5 cm	concentration_r equi_p- _terre_c hamp_e ntree_0 cm	concentration_r equi_p- _terre_c hamp_e ntree_5 cm	concentration_r equi_p- _terre_c hamp_a breuvoir _0cm	concentration_r equi_p- _terre_c hamp_a breuvoir _5cm	concentration_r equi_p- _terre_c hamp_c entre_0 cm	concentration_r equi_p- _terre_c hamp_c entre_5 cm
T0	TEMOIN	0	13,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R0	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	0	400	1200	2000	0	2400	1200
H1	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	800	1200
H2	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	400	0	0
H3	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H4	SPORAD	0	0	0	0	0	800	0	0	0	0	0	400	400	0
H5	TEMOIN	1,67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0
H6	TEMOIN	2,67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H7	SPORAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0	0
H8	ATTEINT	0	0,67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H9	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1200
H10	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 13 : Présentation des résultats : Caractéristiques des paddocks

id_haras	Statut	surf_paddock	chargement_max_paddock	repos_paddock	vent_paddock	temperature_paddock	humidite_paddock	note_poussiere_paddock	chargement_paddock	proportion_terre_paddock
T0	TEMOIN	1855	1	OUI	1	22,8	54,40%	A	200%	4%
R0	ATTEINT	2250	1	NON	0,7	24,0	55,40%	B	100%	10%
H1	ATTEINT	525	1	NON	1,1	20,4	63,70%	B	100%	100%
H2	ATTEINT	9000	20	OUI	2,5	20,5	5050,00%	A	700%	5%
H3	ATTEINT	2500	1	OUI	0,6	25,1	69,60%	B-	100%	15%
H4	SPORAD	450	2	OUI	1,2	20,3	5430,00%	B-	200%	90%
H5	TEMOIN	5500	2	OUI	1	22,0	46,40%	B	100%	4%
H6	TEMOIN	4500	2	OUI	0,7	26,6	43,40%	B+	100%	7%
H7	SPORAD	0,4	8	NON	0,5	28,1	52,60%	A-	100%	8%
H8	ATTEINT	13000	4	NON	1,3	23,0	56,20%	A-	400%	4%
H9	ATTEINT	2250	1	NON	2,3	19,9	63,50%	B	100%	4%
H10	ATTEINT	10000	4	OUI	2,3	21,0	5950,00%	B	100%	7%

id_haras	Statut	proportion_herbe_paddock	nb_aires_sans_herbe_paddock	cip_utilise_paddock	tachymetre_debut_paddock	debut_prlvmt_air_paddock	tachymetre_fin_paddock	fin_prlvmt_air_paddock	pH_terre_paddock	Humidite_terre_paddock	volume_cip_paddock
T0	TEMOIN	96%	3	2	13593	09:35	13650	11:05			0,6
R0	ATTEINT	90	3	3	13640	14:15	12780	14:40			1,8
H1	ATTEINT	0%	TOTAL	1	13501	11:50	12034	13:20			0,9
H2	ATTEINT	95	4	3	12008	10:10	12620	11:40	7,02	26,62%	1
H3	ATTEINT	85%	4	2	13610	10:25	13618	12:05	7,4	26,60%	0,5
H4	SPORAD	10%	1	2	12865	10:30	12730	12:00	7,1	7,30%	1
H5	TEMOIN	96%	3	2		10:00		11:30	6,9	24,10%	0,9
H6	TEMOIN	93%	6	2	13059	11:50	13038	13:20	7,74	22,00%	0,25
H7	SPORAD	92%	7	2	12712	12:12	12859	13:42	7,67	24,75%	0,3
H8	ATTEINT	96%	4	2	12680	10:14	13134	11:45	7,53	21,80%	0,4
H9	ATTEINT	96%	5	1	13200	09:45	13475	11:15	8,32	18,75%	0,85
H10	ATTEINT	93%	2	3	13210	11:50	12950	13:20	7,35	2390,00%	0,35

Annexe 14 : Présentation des résultats : isolement de *Rhodococcus equi* dans les paddocks

id_h aras	Statut	concentration _requi _air_p+ _paddock	concentration_r equi_air _p- _paddock	concentration_r equi_p+ _terre_ _paddock _entree _0cm	concentration_r equi_p+ _terre_ _paddock _entree _5cm	concentration_r equi_p+ _terre_ _paddock _abreu _oir_0cm	concentration_r equi_p+ _terre_ _paddock _abreu _oir_5cm	concentration_r equi_p+ _terre_ _paddock _centre _0cm	concentration_r equi_p+ _terre_ _paddock _centre _5cm	concentration_r equi_p- _terre_ _paddock _entree _0cm	concentration_r equi_p- _terre_ _paddock _entree _5cm	concentration_r equi_p- _terre_ _paddock _abreu _oir_0cm	concentration_r equi_p- _terre_ _paddock _abreu _oir_5cm	concentration_r equi_p- _terre_ _paddock _centre _0cm	concentration_r equi_p- _terre_ _paddock _centre _5cm
T0	TEMOIN	0	6,1	0	0	0	0	0	0	1200	1600	0	1200	0	0
R0	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	800	0	1200	800
H1	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2	ATTEINT	0	0	800	0	0	0	0	0	400	800	0	0	400	1200
H3	ATTEINT	0	0	0	0	0	0	0	800	0	0	0	0	0	400
H4	SPORAD	0	0	0	0	0	400	0	0	0	0	0	400	0	0
H5	TEMOIN	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H6	TEMOIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H7	SPORAD	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H8	ATTEINT	0	0	0	800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H9	ATTEINT	2,84	0	0	0	0	0	0	800	0	0	0	0	0	0
H10	ATTEINT	26,62	2,34	0	0	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 15 : Présentation des résultats : Caractéristiques des boxes

id_haras	Statut	surf_box	fq_retrait_crottins	vent_box	temperature_box	humidite_box	type_sol_box	type_litiere_box	proprete_litiere_box	ventilation_box
T0	TEMOIN	NR	1	0	24	59,00%	BETON	PAILLE	PROPRE	SATISFAISANT
R0	ATTEINT	NR	1	0	25	57,20%	BETON	PAILLE	PROPRE	SATISFAISANT
H1	ATTEINT	NR	30	0	18,6	69,50%	BETON	PAILLE	SOUILLEE	NON ATISFAISANT
H2	ATTEINT	4	30	0	23,5	55	BETON	PAILLE	SOUILLEE	SUFFISANT
H3	ATTEINT	25	7	0	21,2	60%	BETON	PAILLE	SOUILLEE	SATISFAISANT
H4	SPORAD	80	99	0,1	22,1	53,60%	TERRE	PAILLE	SOUILLEE	SATISFAISANTE
H5	TEMOIN	25	1	0	22,3	53,50%	BETON	COPEAUX	PEU SOUILLEE	SATISFAISANTE
H6	TEMOIN	40	30	0	25,8	45,80%	BETON	PAILLE	PROPRE	SATISFAISANTE
H7	SPORAD	8	7	0	23	71,20%	BETON	PAILLE	PROPRE	NON SATISFAISANTE
H8	ATTEINT	16	1	0,5	34	39%	BETON	PAILLE	PROPRE	SATISFAISANTE
H9	ATTEINT	NR	1	0	19,9	NR	BETON	PAILLE	PROPRE	SATISFAISANT
H10	ATTEINT	16	4	NR	NR	NR	BETON	PAILLE		

id_haras	Statut	cip_entree_box	cip_fond_box	tachymetre_debut_box_entree	tachymetre_debut_box_fond	debut_prlvmt_air_box	tachymetre_fin_box_entree	tachymetre_fin_box_fond	fin_prlvmt_box	volume_cip_box_entree	volume_cip_box_fond
T0	TEMOIN	3	1	13372	11670	09:50	13638	11785	11:20	1,4	1,3
R0	ATTEINT	1	2	13630	13485	14:27	11710	12830	15:55	1,3	1,4
H1	ATTEINT	3	2	13503	12975	10:25	13685	12612	11:55	1,8	1,9
H2	ATTEINT	1	2	13500	12990	10:00	13601	13220	11:30	1,3	1,1
H3	ATTEINT	3	1	12493	11811	10:43	12236	13492	12:15	1,8	1,1
H4	SPORAD	1	3	13510	12480	10:40	12501	12830	12:10	1,5	1,4
H5	TEMOIN	3	1			10:15			11:45	1	1,8
H6	TEMOIN	1	3	13549	12062	10:40	13565	11691	12:30	0,9	1
H7	SPORAD	1	3	13545	13038	10:12	13213	12823	11:43	1,3	1,4
H8	ATTEINT	3	1	12014	12597	10:32	12158	13410	12:02	1,2	0,9
H9	ATTEINT	2	3	13460	13540	10:00	13650	13699	11:30	1,05	1,1
H10	ATTEINT	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Annexe 16 : Présentation des résultats, isolement de *Rhodococcus equi* dans les boxes

id_haras	Statut	concentration_requi_ai r_p+_box_entree	concentration_requi _air_p-_box_entree	concentration_requi_air_ p+_box_fond	concentration_requi_air_ _p-_box_fond	requi_p+_s ol_box	requi_p- _sol_box
T0	TEMOIN	0	0	0	0		
R0	ATTEINT	0	0	0	0		
H1	ATTEINT	0	0	0	0	0	0
H2	ATTEINT	0	4,3	0	4,3	0	0
H3	ATTEINT	0	0	0	0	0	0
H4	SPORAD	0	0	0	0	0	0
H5	TEMOIN	0	0	12	0	0	0
H6	TEMOIN	0	0	0	0	0	0
H7	SPORAD	0	0	0	0	0	0
H8	ATTEINT	0	0	0	0	0	0
H9	ATTEINT	0	0	0	0	0	0
H10	ATTEINT	NR	NR	NR	NR	NR	NR

CORRELATION BETWEEN VIRULENT AND NON VIRULENT RHODOCOCCLUS EQUI BURDEN IN FOALS' ENVIRONNEMENT AND THE PRESENCE OF CLINICAL CASES IN BASSE-NORMANDIE STUD FARMS (FRANCE)

SURNAME : ROY

Given name : Edmond

Summary

Rhodococcosis is the first cause of mortality for 1 to 6 months-old foals. Foals' infection by *Rhodococcus equi* virulent contaminated dusts is actually admitted. We achieved a comparative study in 3 healthy and 6 infected studs, in Basse-Normandie (France). In each location, we filled an epidemiologic form, and made weather measurements, air and soil prelevements for bacteriological analysis, in one box, one paddock and one field. Air prelevements, were made according to an innovative technique developed in 2011 by the ANSES-Dozulé laboratory, with a device attached to the mare, making a 90 minutes continuous prelevement. In the studied studs, results indicate that paddock is the higher risk-zone for foals infection. On the other hand, in boxes we found very few *Rhodococcus equi*, that tends to indicate that this is not an important location for foals contamination.

Keywords

**RHODOCOCOSIS / RHODOCOCCLUS EQUI / BRONCHOPNEUMONIA / NECROPSY / PRELEVEMENT
TECHNIQUE / DUST / AEROSOL / EPIDEMIOLOGICAL STUDY / STUD FARM / BREEDING / HORSE /
FOAL / BASSE NORMANDIE**

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. Sophie PRADIER

Assessor : : Pr. Henri-Jean BOULOUIS

Guest : Dr. Jackie TAPPREST

CORRÉLATION ENTRE LA PRÉSENCE DE *RHODOCOCCLUS EQUI* VIRULENT ET NON VIRULENT DANS L'ENVIRONNEMENT DES POULAINS ET LA PRÉSENCE DE CAS DANS LES HARAS EN BASSE-NORMANDIE

NOM et Prénom : ROY Edmond

Résumé

La rhodococcose est la première cause de mortalité chez le poulain de 1 à 6 mois. Il est actuellement admis que les poulains s'infectent principalement par inhalation de poussières contaminées par *Rhodococcus equi* virulent. Nous avons réalisé une étude comparative entre 3 haras sains et 6 haras atteints de Basse-Normandie, comprenant un questionnaire épidémiologique, des mesures climatiques, des prélèvements d'air et de sol pour analyse en bactériologie dans un box, un paddock et un champ de chaque élevage étudié. Les prélèvements d'air ont été réalisés à partir d'une technique mise au point au laboratoire l'année dernière avec un appareil embarqué sur les juments et réalisant un prélèvement continu pendant 90 minutes. Les résultats semblent indiquer que le paddock est le lieu le plus à risque pour l'infection des poulains dans les haras étudiés. Dans le box, très peu de *Rhodococcus equi* ont été retrouvés, ce qui tend à prouver que les boxes ne sont pas un lieu à risque pour l'infection des poulains dans les haras étudiés.

Mots clés

RHODOCOCCHOSE / *Rhodococcus equi* / BRONCHOPNEUMONIE / AUTOPSIE / TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT / POUSSIÈRE / AÉROSOL / ENQUÊTE ÉPIDÉMIOLOGIQUE / HARAS / ÉLEVAGE / ÉQUIDÉ / CHEVAL / POULAIN / BASSE-NORMANDIE

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Sophie PRADIER

Assesseur : Pr. Henri-Jean BOULOUIS

Invité : Dr. Jackie TAPPREST