

3 Étude expérimentale

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

3.1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

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

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

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

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

3.2 MATÉRIEL

3.2.1 Critères de sélection des haras

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

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

3.2.2 Présentation des haras retenus

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

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

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

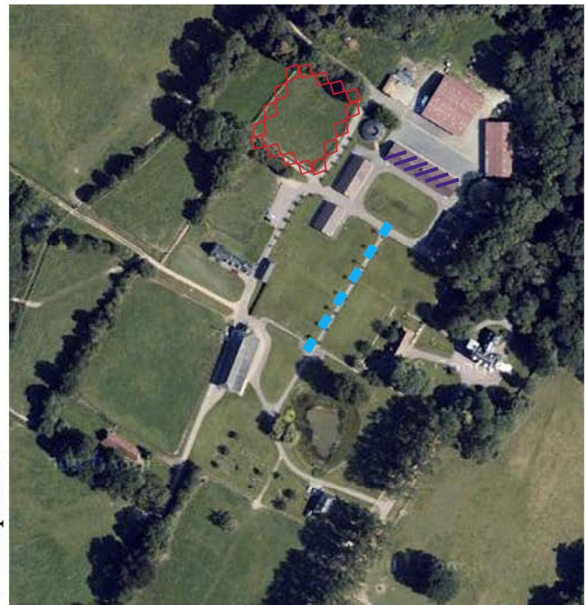
3.2.3 Choix des différentes surfaces

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

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

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

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



Vue rapprochée

Légende

- | | | | |
|---------|---------|---------|----------------|
| ● ● ● ● | Champ | //// | Box |
| ◇ ◇ ◇ ◇ | Paddock | ■ ■ ■ ■ | Allée centrale |

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



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

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



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

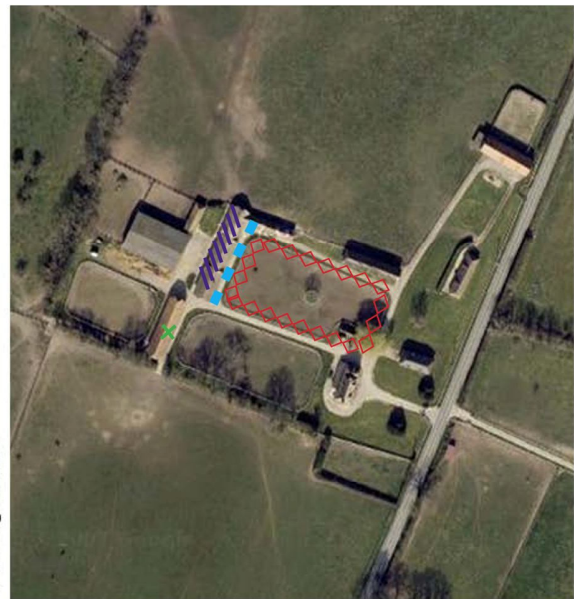
Photographie n° 45: Prélèvement dans le champ du haras H1



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

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

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



Vue rapprochée

Légende

- | | | |
|--------------|----------------------|----------------------|
| ●●●● Champ | //// Box | × Box de gynécologie |
| ◇◇◇◇ Paddock | ■ ■ ■ Allée centrale | |

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



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

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



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

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



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

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

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

3.3 MÉTHODE

3.3.1 Organisation de l'étude

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

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

3.3.2 Protocoles retenus

3.3.2.1 Relevé des conditions climatiques et des conditions de terrain

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

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

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

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

Matériel :

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

Méthode :

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

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

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



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



3.3.2.3 *Quantification des poussières totales en aérosols*

Matériel :

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

Méthode :

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

3.3.2.4 *Quantification de Rhodococcus equi dans les sols*

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

Matériel :

- Tarière, Piluliers en plastique identifiés, Gants.

Méthode :

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

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



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



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



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



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



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



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



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



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



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



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



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

