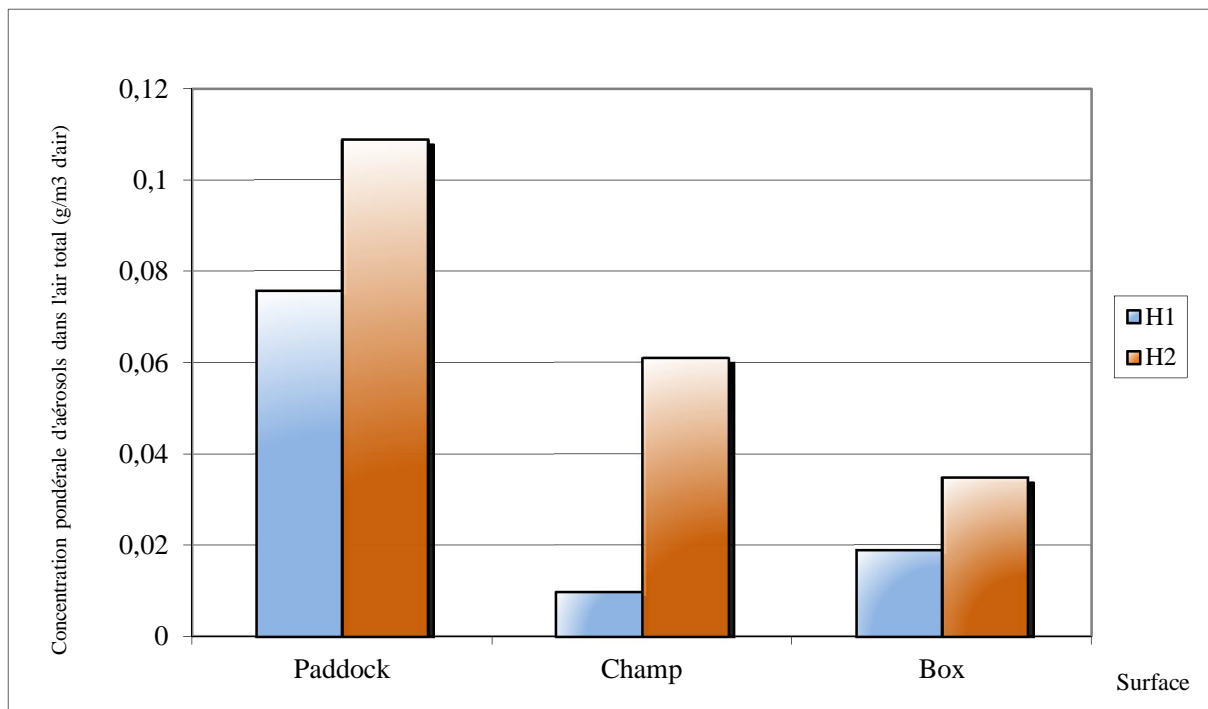


### 3.5.5 Analyse des données provenant des concentrations pondérales de poussières dans l'air

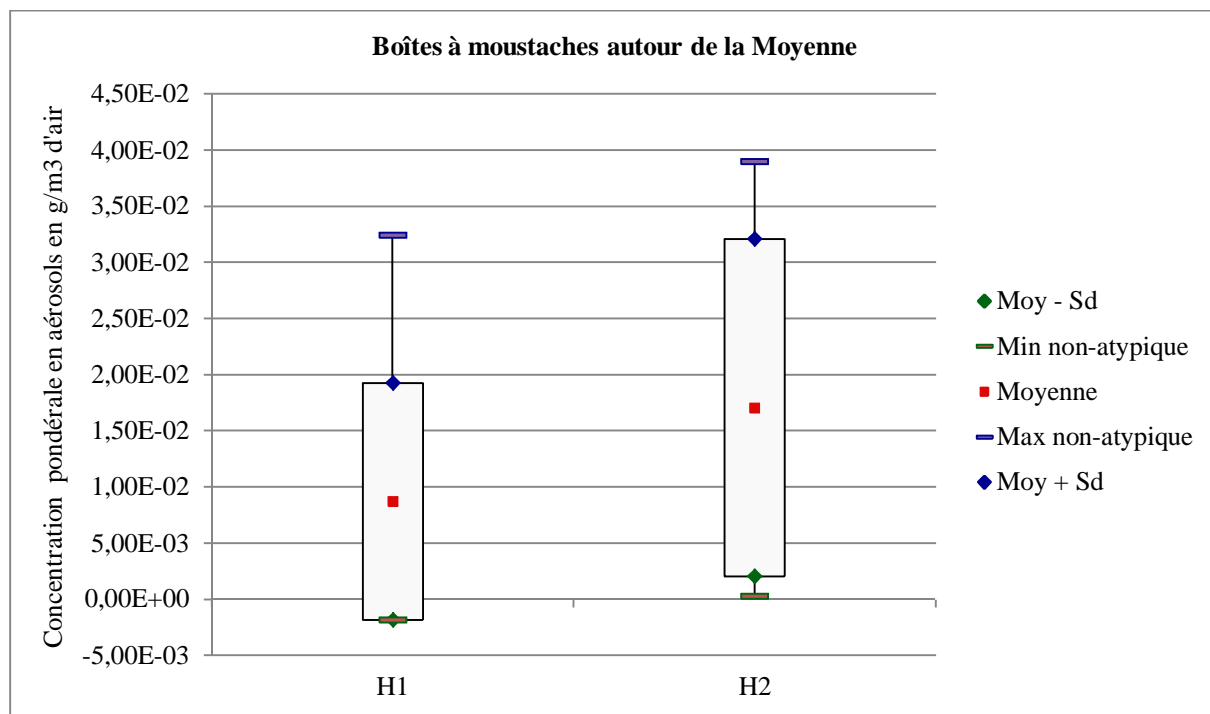
Comme expliqué précédemment, la mesure des concentrations pondérales en aérosols alvéolaires ne s'est pas avérée fiable lors des deux premières séances. En effet, ce mode de prélèvement n'autorise que la collecte des aérosols dont le diamètre est inférieur à  $4\ \mu\text{m}$ . Compte tenu de la masse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

Figure n° 23: Concentrations pondérales en aérosols de l'air total (en  $\text{g}/\text{m}^3$  d'air) cumulées sur 4 séances de prélèvements selon chaque type de surface et haras



D'après la figure n° 23, nous observons que les concentrations pondérales en aérosols dans l'air total sont plus élevées dans le haras H2 que le haras H1. Nous avons donc comparé les mesures des concentrations en poussières dans l'air pour chaque haras (figure n° 24). Pour chaque haras, les données concernent les trois surfaces : box, champ et paddock. L'hypothèse  $H_0$  est que « les concentrations moyennes de poussières mesurées dans le haras H1 et H2 ne sont pas significativement différentes ». L'analyse statistique complète est présentée en annexe n° 22.

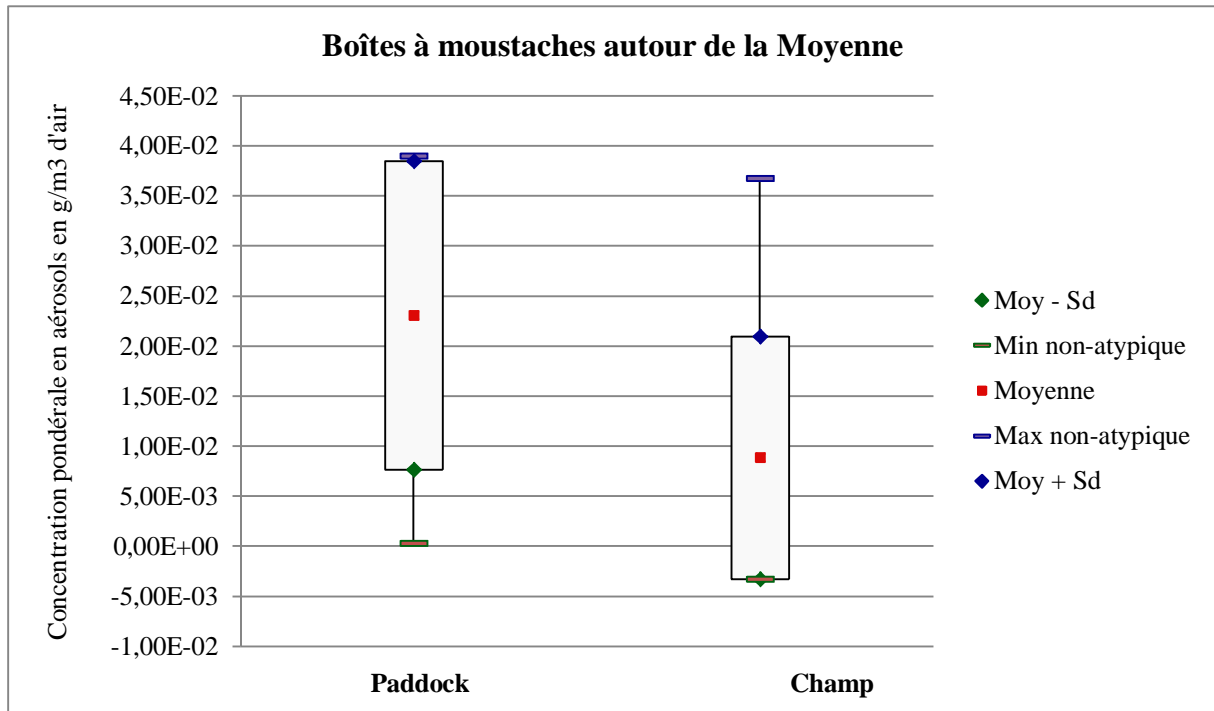
Figure n° 24: Résultats du test Mann-Whitney. Illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent a concentration pondérale de poussières en  $g/m^3$  d'air



La valeur de Z calculée avec le test de Mann-Whitney est trop faible pour rejeter l'hypothèse  $H_0$ . Nous en concluons donc que les concentrations en poussières dans l'air des deux haras ne sont pas significativement différentes.

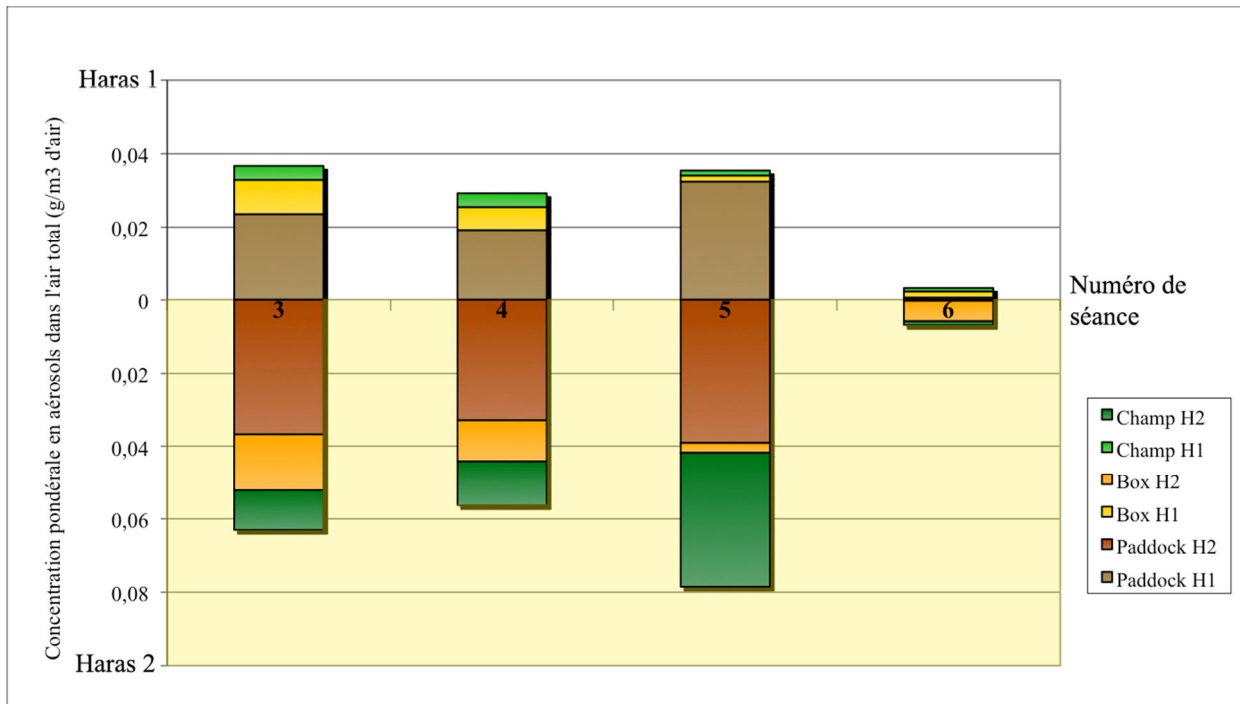
D'après la figure n° 23, nous remarquons également que les paddocks semblent être les surfaces dans lesquelles les poulains sont les plus exposés à la poussière et ce dans les deux haras. Notre hypothèse  $H_0$  est que «les concentrations moyennes de poussières mesurées dans les paddocks et dans les champs ne sont pas significativement différentes». L'analyse statistique chiffrée est présentée en annexe n° 23. La figure n° 25 présente les résultats sous forme graphique.

Figure n° 25: Résultats du test Mann-Whitney. Illustration graphique. Les valeurs en ordonnées représentent la concentration pondérale de poussières en  $\text{g/m}^3$  d'air



Nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse  $H_0$ . Nous en concluons donc que les concentrations en poussières dans l'air du paddock et du champ ne sont pas significativement différentes. Bien qu'il existe une différence entre les concentrations pondérales d'aérosols obtenues entre le haras H1 et H2 ainsi que pour celles obtenues entre les paddocks et les champs, nos valeurs ne sont pas significativement différentes. Cela est probablement dû à la taille réduite de nos effectifs. Nous avons étudié l'évolution de la concentration pondérale en aérosols en fonction des séances pour chaque haras.

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



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

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

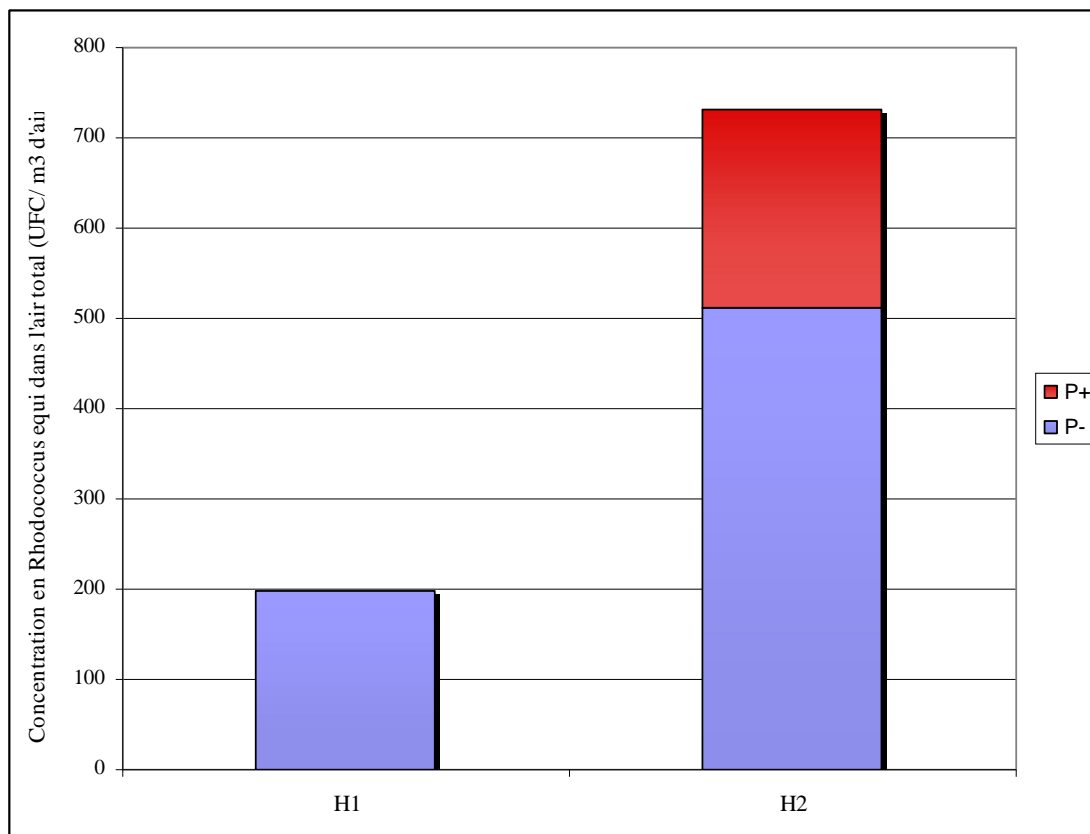
dégradation au sein de la même catégorie. Aussi nous avons constaté une excellente concordance entre les évaluations qualitative et quantitative. En effet, pour chaque surface, les lettres signant une présence plus importante de poussières sont associées avec les concentrations pondérales en aérosols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

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

#### 3.5.6.1 Comparaison selon le type de haras

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

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



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

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

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

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

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

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

	H1	H2	Total
Présence de P+	0	5	5
Absence de P+	8	3	11
<b>Total</b>	8	8	16

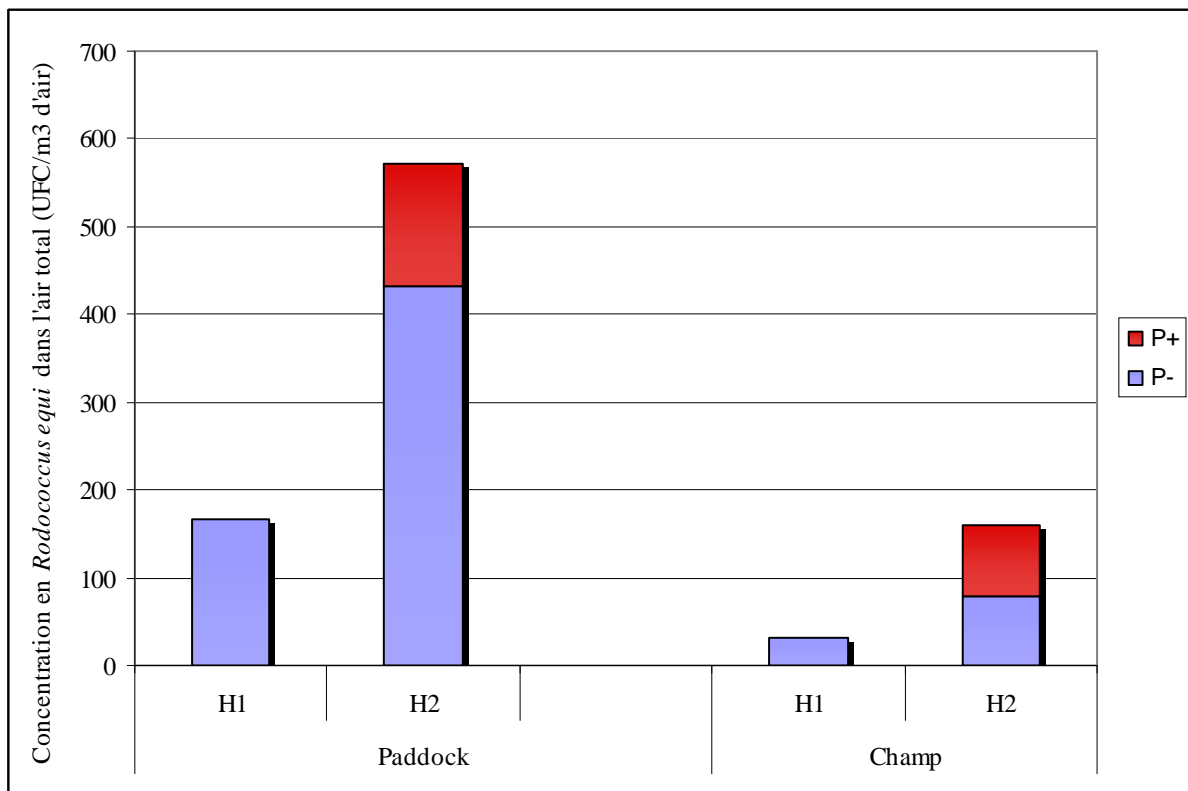
Nous avons utilisé de test de Fisher. Il ressort que nous pouvons rejeter l'hypothèse H0 avec le risque  $p < 0,013$  de commettre une erreur. En conclusion, nous retenons que la présence de *Rhodococcus equi* virulent dans l'air est significativement liée au statut du haras. Nous avons donc mis en évidence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

Dans une étude dans 22 élevages contaminés, des prélèvements d'air ont été effectués avec un collecteur d'air à impaction (Muscatello *et al.*, 2006a). Parmi les 768 prélèvements effectués, les concentrations en *Rhodococcus equi* total au paddock varient entre 0 et 124 UFC/m<sup>3</sup> d'air collecté et leur médiane est de 2 UFC/m<sup>3</sup> d'air. Les valeurs dans cette étude sont plutôt inférieures à celles que nous avons mesurées dans l'air du paddock du haras H2. À titre de comparaison, nous avons mesuré des concentrations s'échelonnant de 0 à 387 UFC/m<sup>3</sup> pour une valeur moyenne de 38,8 UFC/m<sup>3</sup>.

### 3.5.6.2 Comparaison selon le type de surface

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

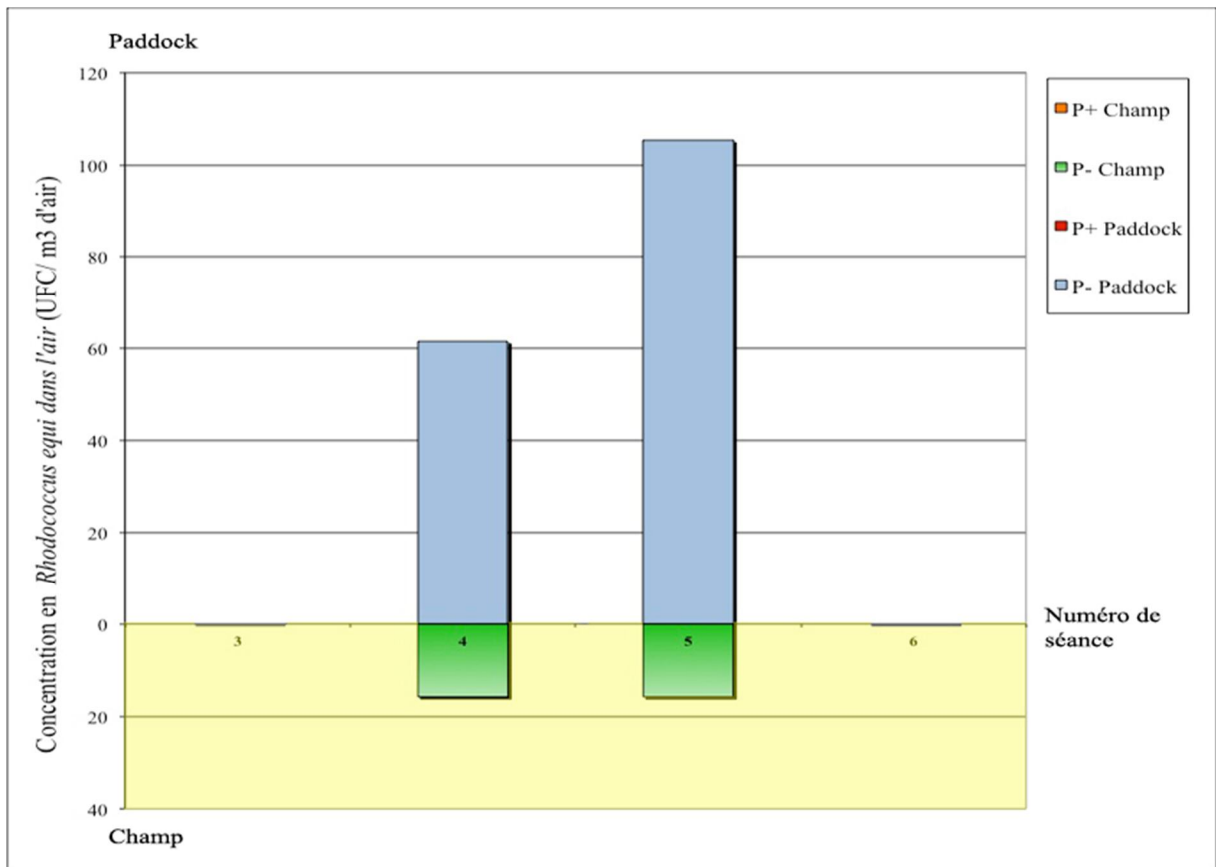
Dans une autre étude évaluant l'impact du site de collecte sur les concentrations mesurées (Kuskie *et al.*, 2011), les concentrations en *Rhodococcus equi* virulent atteignent 16 UFC/m<sup>3</sup> au box et 8 UFC/m<sup>3</sup> au paddock. De même, une seconde étude a mis en évidence des concentrations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



### 3.5.6.3 Évolution au cours du temps

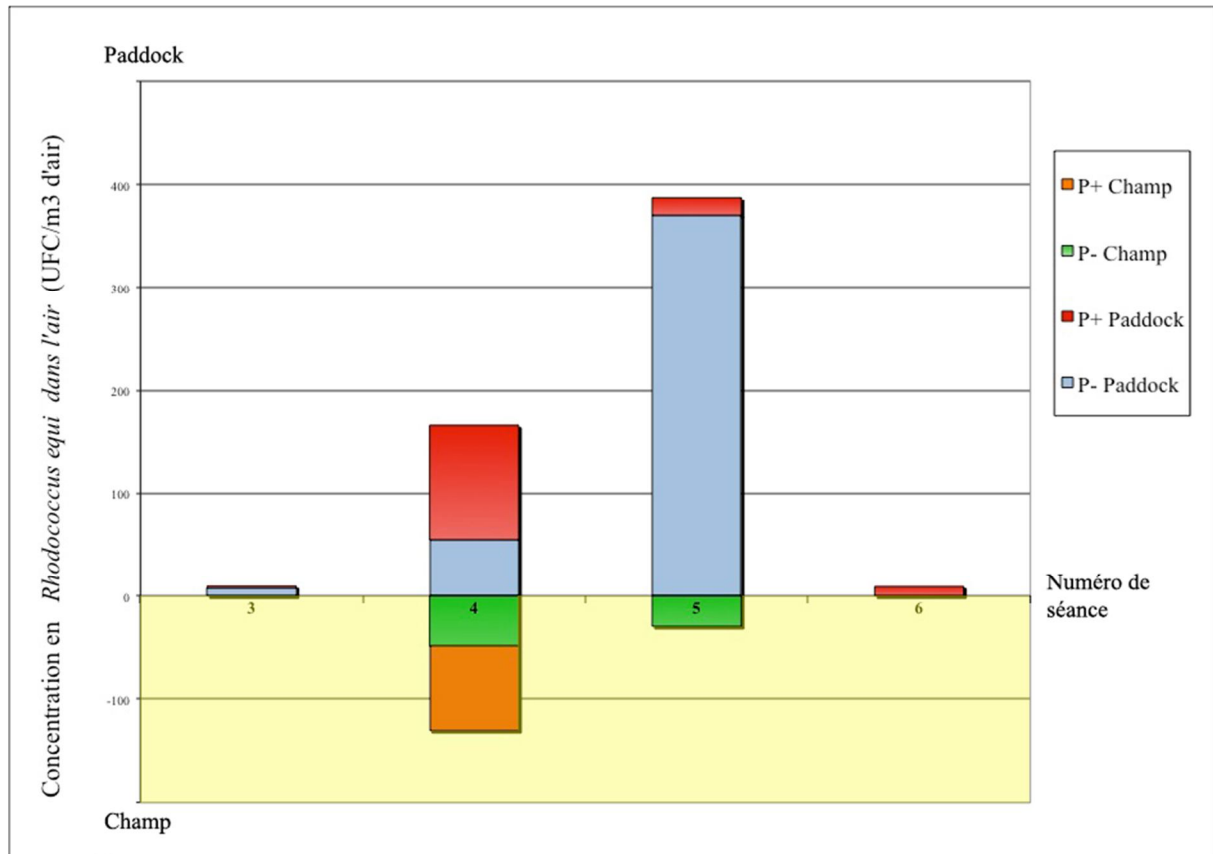
Étudions à présent les concentrations en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents en fonction du temps.

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



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

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

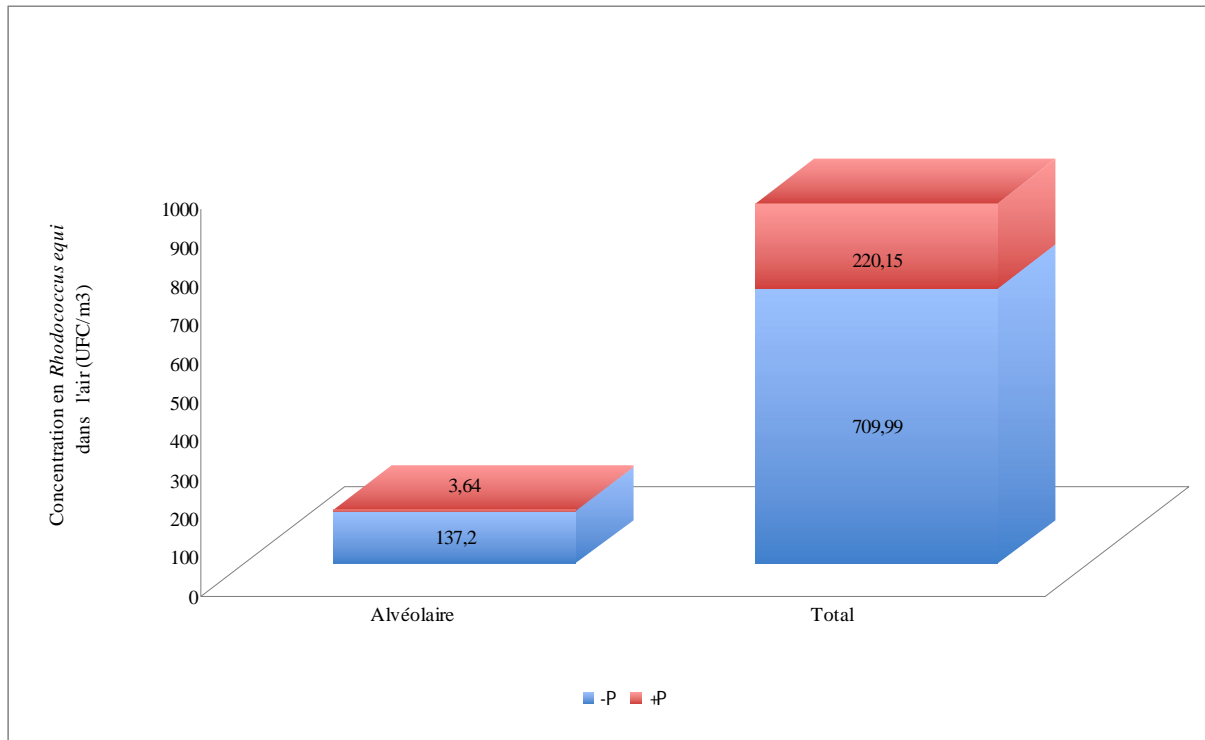


D'après la figure n° 30, nous constatons la présence de *Rhodococcus equi* dans le paddock lors des quatre séances. Cependant, la bactérie est présente de manière plus marquée lors des séances n° 4 et n° 5. Lors de la séance n° 4, nous observons que la proportion de *Rhodococcus equi* virulent est très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

#### 3.5.6.4 Comparaison selon la fraction de l'air

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

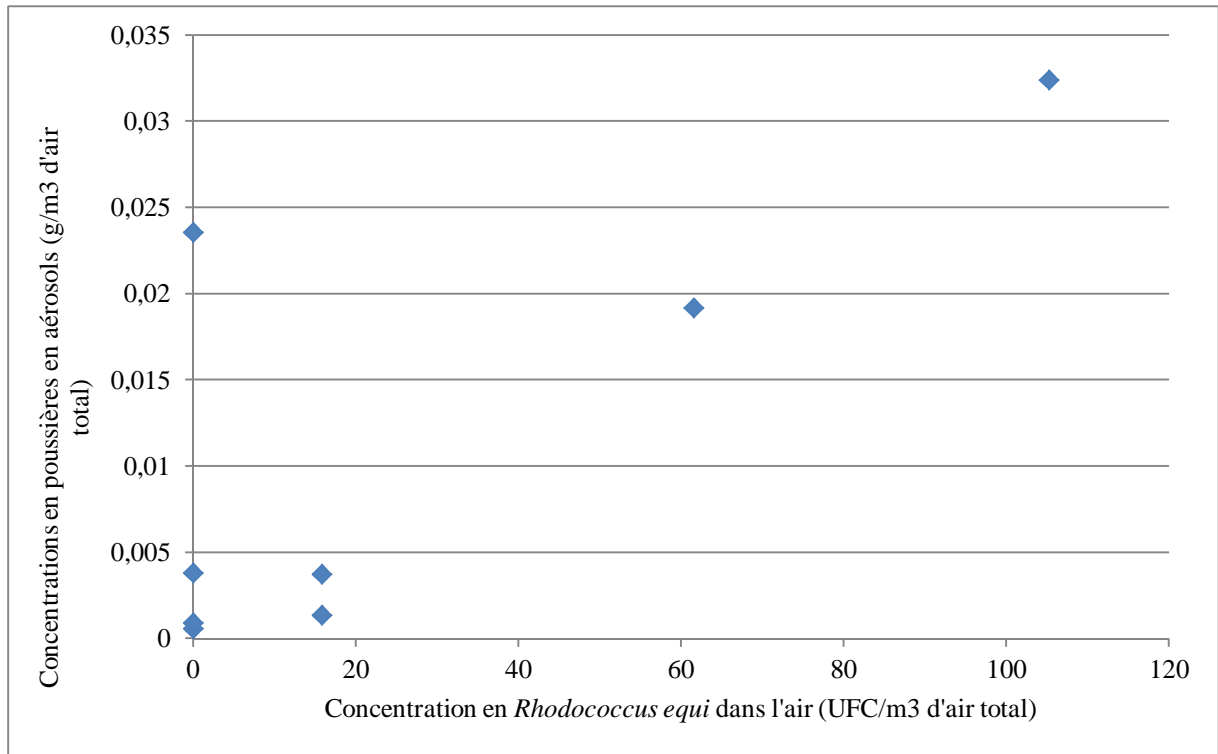
Différentes études rapportent que la présence de poussières dans l'environnement des poulains constitue un facteur de risque important (Muscatello *et al.*, 2006a ; Cohen *et al.*, 2005 ; Tapprest *et al.* 2012). Pourtant aucune mesure de la concentration pondérale en aérosols n'a été effectuée jusqu'alors.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

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

Ainsi pour le haras H1, le coefficient calculé est de 0,511. L'intervalle de confiance à 95% est [-0,303 ; 0,894]. Le coefficient de détermination est de 26,1%. Étant donné que  $|0,511| < 0,74$ , nous ne pouvons pas rejeter H0. Nous concluons qu'il n'existe pas de relation significative avec comme limite la faible taille de nos effectifs.

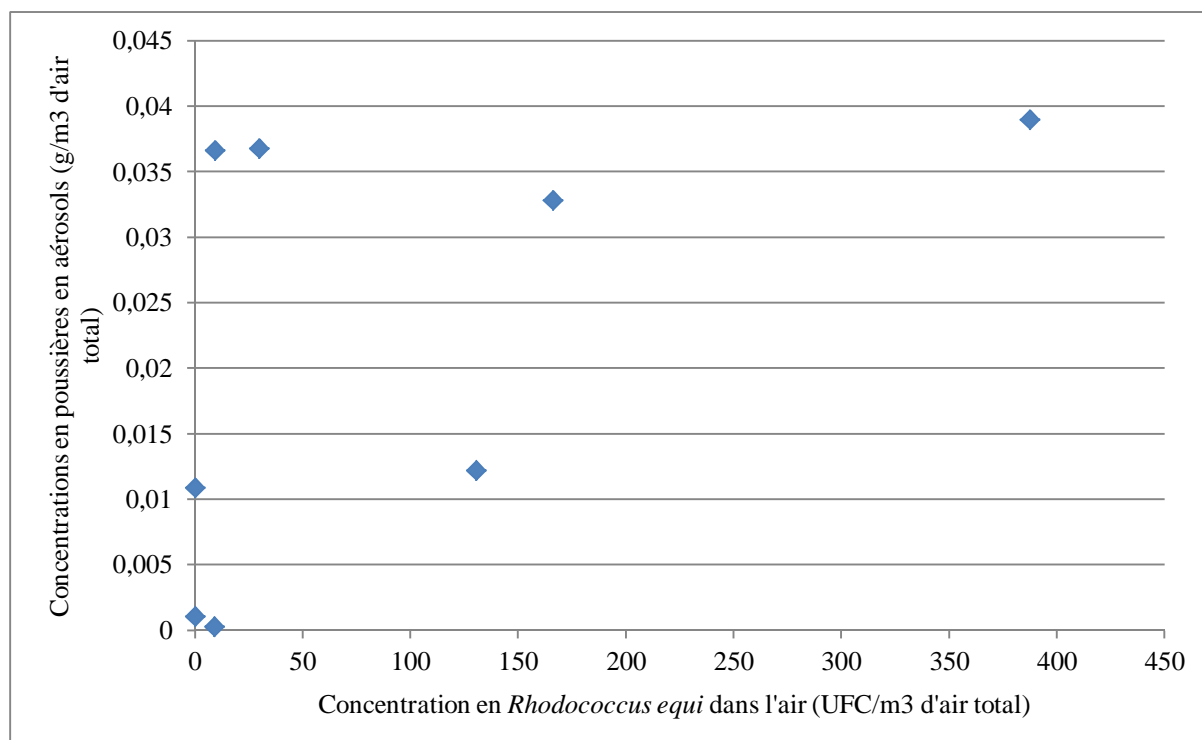
Les figures n° 32 et n° 33 sont les représentations graphiques des tests de corrélation de Spearman pour les haras H1 et H2.

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



Ainsi pour le haras H2, le coefficient calculé est de 0,732. L'intervalle de confiance à 95% est [0,0533 ; 0,947]. Le coefficient de détermination est de 53,4%. Étant donné que  $|0,731| < 0,74$ , nous ne pouvons pas rejeter  $H_0$ . Nous concluons qu'il n'existe pas de relation significative avec comme limite la faible taille de nos effectifs.

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



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

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

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

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

La source de *Rhodococcus equi* dans le sol joue un rôle important. Nous avons étudié l'existence d'une corrélation entre les concentrations en *Rhodococcus equi* dans l'air et celle dans le sol aux faibles profondeurs (en surface et à 5 cm) pour chaque haras. La comparaison de la figure n° 34 avec la figure et celle de la figure n° 35 avec la figure n° 30 ne permet pas *a priori* de suspecter une telle corrélation. Nous avons tout de même calculé les coefficients de Spearman pour chaque haras. Ainsi, pour le haras H1, nous avons un coefficient de 0,283. Pour le haras H2, ce coefficient est de 0,110. Étant donné que  $|V_{\text{calc}}| < 0,74$ , nous ne pouvons pas rejeter  $H_0$ . Il n'y a donc pas de lien statistiquement significatif entre la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol aux faibles profondeurs et celle dans l'air. Ce résultat peut s'expliquer car certaines conditions environnementales sont certainement nécessaires pour que la bactérie puisse être retrouvée dans l'air. Ainsi si la concentration en *Rhodococcus equi* dans le sol est élevée mais que le temps est pluvieux, la bactérie a peu de chances d'être isolée dans l'air ; c'est le cas de la séance n° 6. Ces observations soulignent l'intérêt de mesurer la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'air.



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

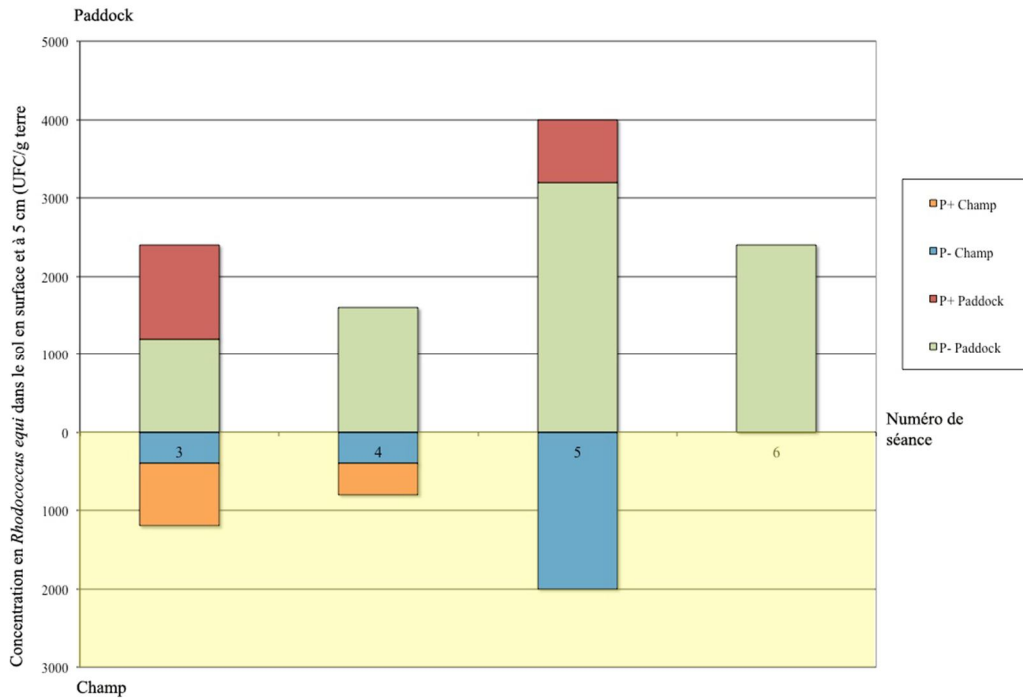
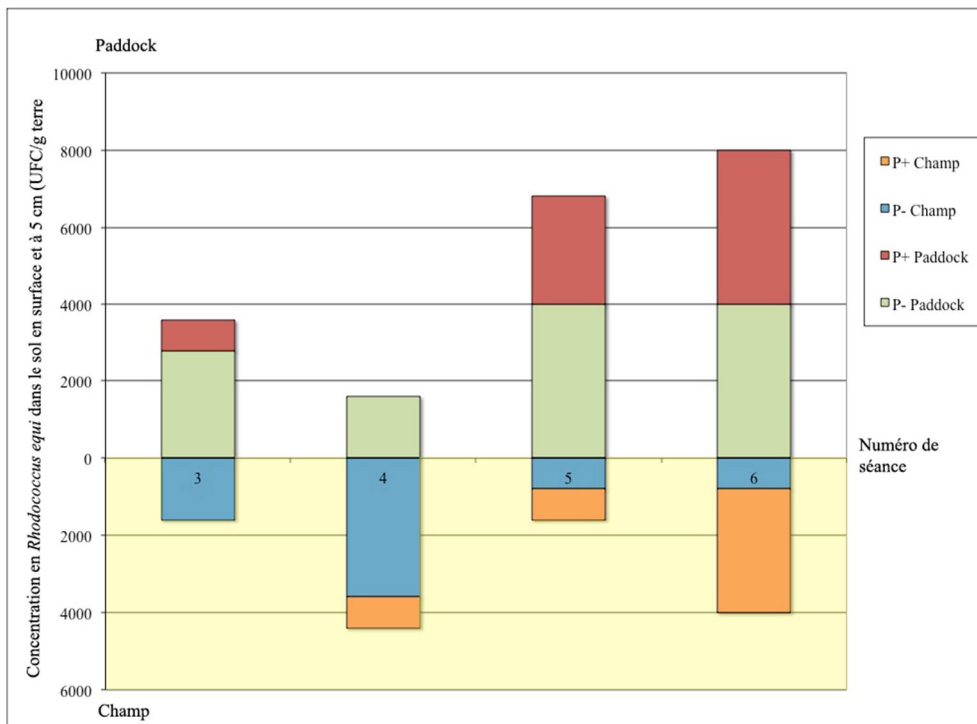


Figure n° 35: Concentration en *Rhodococcus equi* virulents et non virulents dans la portion superficielle du sol (surface et 5 cm) au cours du temps pour le haras H2. Les valeurs mesurées dans le paddock sont représentées en ordonnées vers le haut, celles du champ vers le bas



### 3.6 EXPÉRIENCE COMPLÉMENTAIRE

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

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



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

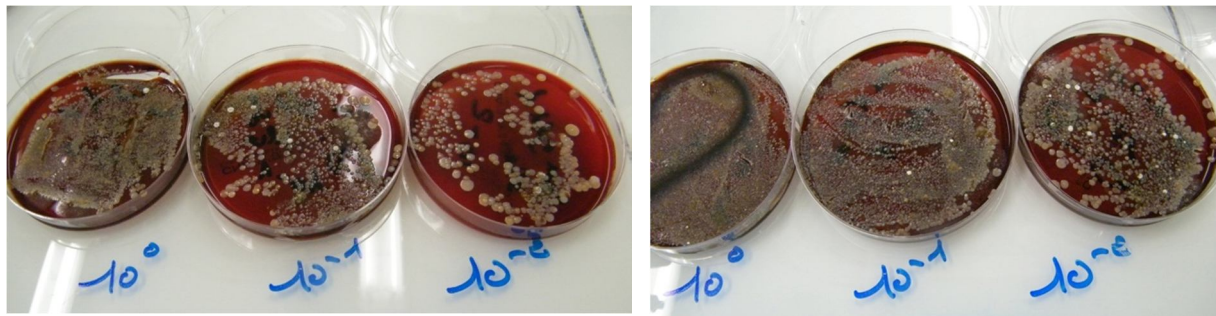


L'expérience s'est bien déroulée. Les résultats des mises en culture sont présentés à la photographie n° 67

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

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

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



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

### 3.7 DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

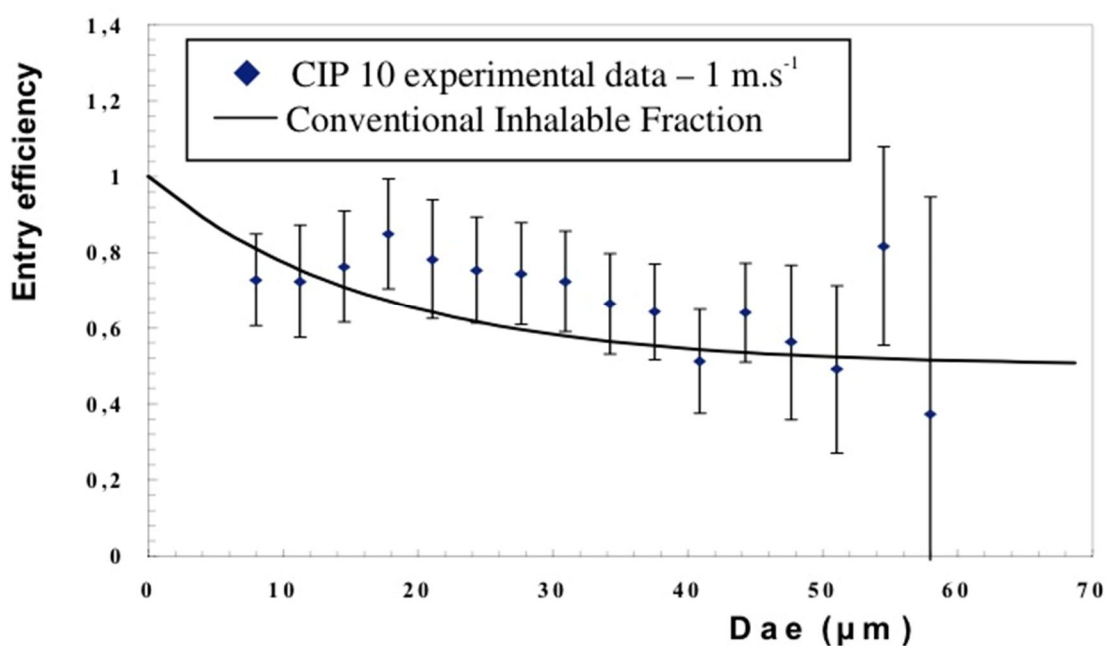
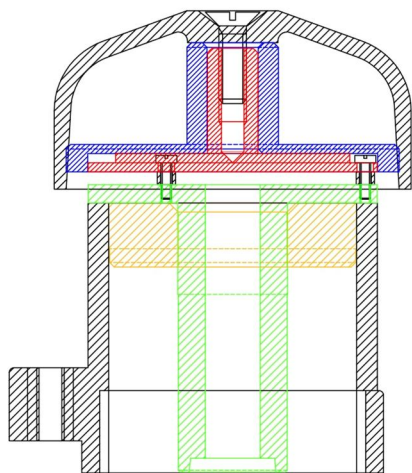


Figure n° 37: Vue en coupe longitudinale de la tête du CIP 10I. Dessin technique fourni par ARELCO



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

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

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

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

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

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

### 3.8 PERSPECTIVES

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

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



MCours.com