

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

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

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

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

	Air idéal® 3P	Pompe Deluxe 224-PCFX8	CIP
Taille (mm)	128x146x208	49x119x130	170x70x45
Poids (g)	3 000	1500	300
Niveau sonore (dB)	Élevé	Modéré	Faible
Fixation	Poignées, difficile de l'installer sur un cheval	Sacoche	Baudrier ou potence
Débit d'aspiration	Fixe, étalonné à 100 l/min	Variable, à étalonner Entre 0,5 l/min et 4 l/min Possibilité d'acheter un banc pour l'étalonnage	Fixe, étalonné à 10l/min par le fabricant Proche de la valeur physiologique chez le poulain
Filtration de l'air	Pas de filtration de l'air	Sélection selon le filtre contenu dans la cassette	Possibilité de récolte des fractions totales ou sélection de la fraction thoracique ou alvéolaire
Fonction	Bactéries	Bactéries	Bactéries et poussières

	Air idéal® 3P	Pompe Deluxe 224- PCTX8	CIP
Dépendance site prélèvement/moteur	Milieu de prélèvement solidaire du moteur	Milieu de prélèvement raccordé par un tube de plastique flexible au moteur	Milieu de prélèvement solidaire du corps du CIP
Programmation des prélèvements	Programmable. Prélèvements séquencés ou différés	Programmable. Prélèvements séquencés ou différés	Non programmable
Position lors du fonctionnement	Fonctionne dans toutes les positions	Le moteur doit être positionné à la verticale	Fonctionne dans toutes les positions
Coût unitaire de prélèvement (consommable et analyses, hors main d'œuvre)	Faible (estimé à 1 euro)	Élevé (environ 7 euros)	Faible (estimé à 1 euro)
Contamination par moisissures	Très importante	Absente	Absente
Mise en route	Interrupteur	Avec un tournevis. Fiable	Électromagnétique. Fiable
Témoin de fonctionnement	Niveau sonore	Compteur à cristaux liquide (temps de collecte indiqué) Niveau sonore	LED rouge Niveau sonore
Autonomie batterie	5h	>6h	>40h
Type d'aspiration	Aspiration unidirectionnelle	Aspiration omnidirectionnelle	Aspiration omnidirectionnelle

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

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

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

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

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

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

2.3.1.4.1 En milieu confiné

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

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

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

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

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

Calcul :

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

Application numérique :

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

2.3.1.4.2 En extérieur, sur la parcelle en terre

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

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

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

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

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

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

2.3.1.5.1 Enseignements des résultats

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

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

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

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

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

2.3.1.5.2 Intérêt de la mise en place d'un boudrier

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

2.3.1.5.3 Cahier des charges et conception

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

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



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



2.3.1.6 Premier essai à l'ANSES

2.3.1.6.1 Matériel retenu

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

Matériel :

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

2.3.1.6.2 Protocole retenu

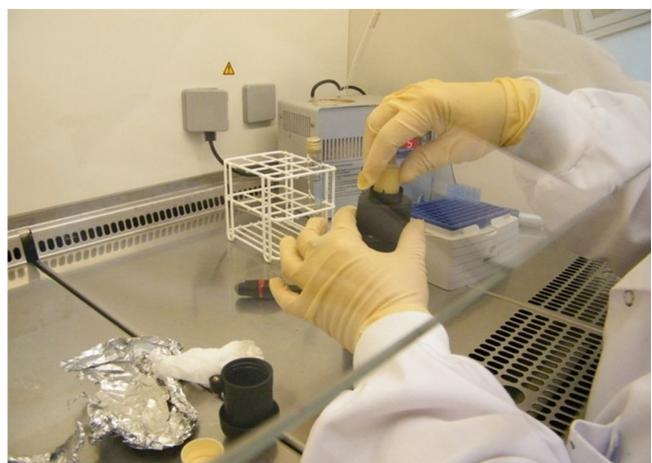
Protocole:

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

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

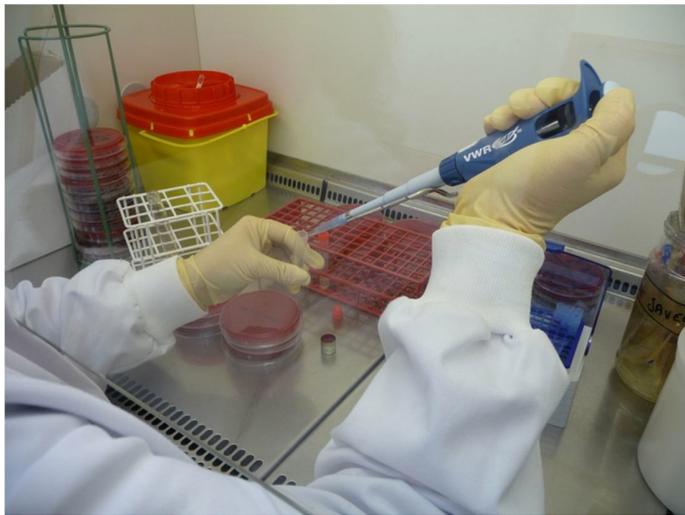
Lors de la mise en route du CIP 10 MR, nous avons surveillé les réactions de la jument. Celle-ci n'a manifesté aucune forme de crainte ou d'inquiétude lors de la fixation de l'appareil. La masse portée sur le côté du licol n'a pas semblé gêner la jument. En revanche lors de l'orientation du CIP 10 MR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

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

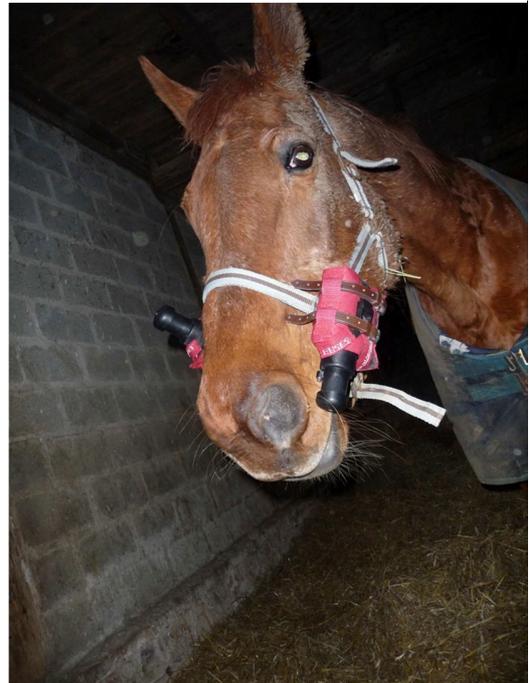


rapport à celui initialement prévu éloigne très légèrement la tête alvéolaire des naseaux. Toutefois l'aspiration est omnidirectionnelle, la validité du raisonnement ne peut donc être remise en question. Enfin, après la mise en route du CIP 10 MR et lors de sa fixation sur la jument, nous avons constaté qu'un petit volume de BHI s'est écoulé par la sortie tangentielle de l'appareil. De là, nous avons choisi d'abaisser le volume de BHI initialement introduit à 2,5 ml au lieu de 3,0 ml.

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



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



2.3.1.6.3 Résultats obtenus

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

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

Nombre de colonies (UFC)		CIP 10 MR		
Numéro de triplicata		1	2	3
Dilutions	10 ⁰	0	0	0
	10 ⁻¹	0	0	0

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

2.3.1.7 Validation du protocole dans deux haras

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

2.3.1.7.1 Choix du haras

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

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

2.3.1.7.2 Choix des surfaces

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

2.3.1.7.3 Choix du porteur du CIP

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

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

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



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

2.3.1.7.4 Résultats, discussion et enseignements

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

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

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

2.3.2 Quantification des poussières dans l'air

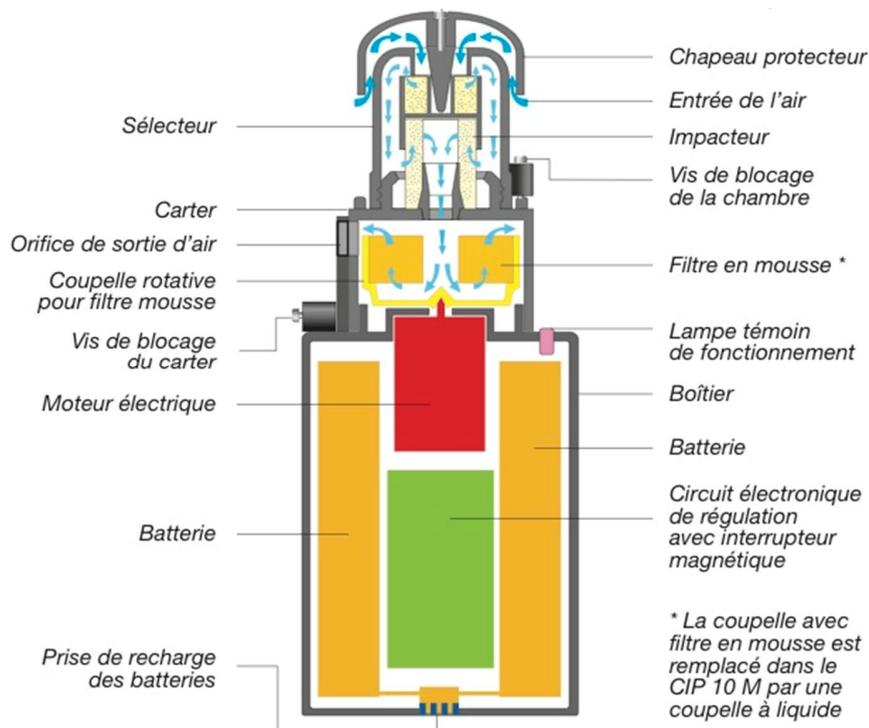
Par le passé plusieurs auteurs ont suggéré le rôle que pourraient avoir les poussières dans l'aérosolisation de *Rhodococcus equi* (Chaffin *et al.* 2003b; Tapprest *et al.*, 2012). Certains ont tenté d'établir des corrélations entre un paramètre climatique et la prévalence clinique de la maladie ou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

2.3.2.1 Présentation de la technique

2.3.2.1.1 Mode de fonctionnement

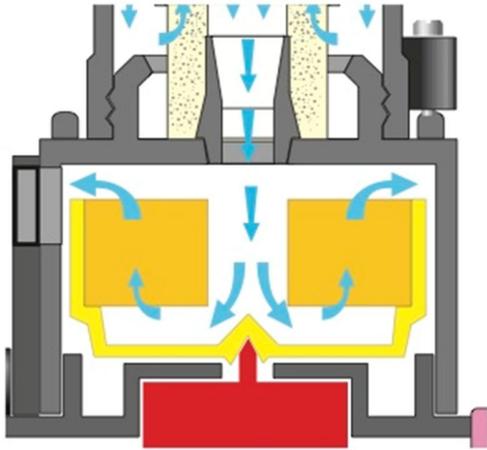
Le CIP dans sa version CIP 10 permet de mesurer une quantité de poussières dans l'air. Selon un principe similaire à celui décrit pour le CIP 10 M, le CIP 10 comporte une coupelle rotative équipée d'une mousse de polyuréthane, montée sur l'arbre d'un moteur tournant à grande vitesse à l'intérieur d'une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

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



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

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

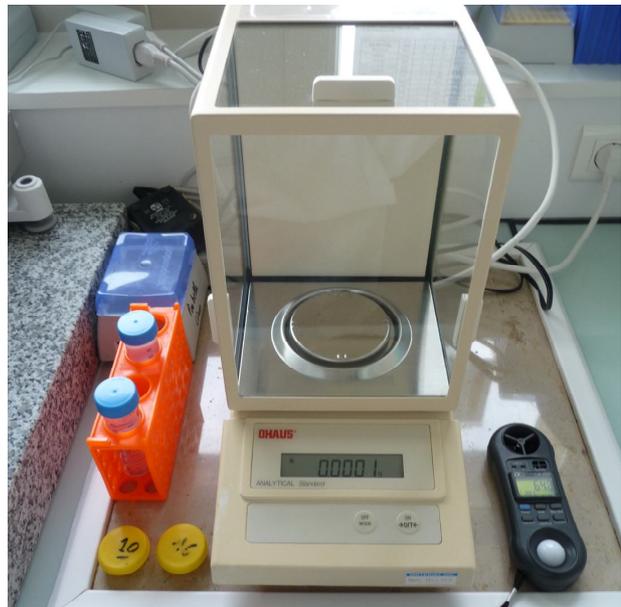


Pour évaluer la quantité de poussières nous avons étudié la concentration pondérale des aérosols sur mousse rotative. Le principe est donc d'évaluer la quantité de poussière en aérosols en mesurant la différence de masse entre la mousse avant et après le prélèvement.

2.3.2.1.2 Protocole de pesée et préparation des mousses

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

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



Matériel :

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

Protocole :

Pesée avant prélèvement

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

Pesée après prélèvement

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

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

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

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

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



Protocole :

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

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

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

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

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

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

2.3.2.3 *Perfectionnement du protocole*

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

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

Matériel:

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

Protocole:

Opérations préalables

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

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

Pesée des coupelles (avec mousses)

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

Ouverture des échantillonneurs

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

Pesée

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

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

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

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

La concentration pondérale de l'aérosol dans l'atmosphère prélevée C_x (en g/m^3) est exprimée ainsi :

$$C_x = Q_x / V$$

Où V est le volume d'air prélevé exprimé en m^3 .

2.3.2.4 Premier essai à l'ANSES

2.3.2.4.1 Matériel retenu

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

Matériel :

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

2.3.2.4.2 Protocole retenu

Préparation des mousses

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

Les mousses sont identifiées comme suit :

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

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



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



Pesée des mousses avant prélèvement

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

Tableau n° 17: Masses des coupelles mesurées avant prélèvement

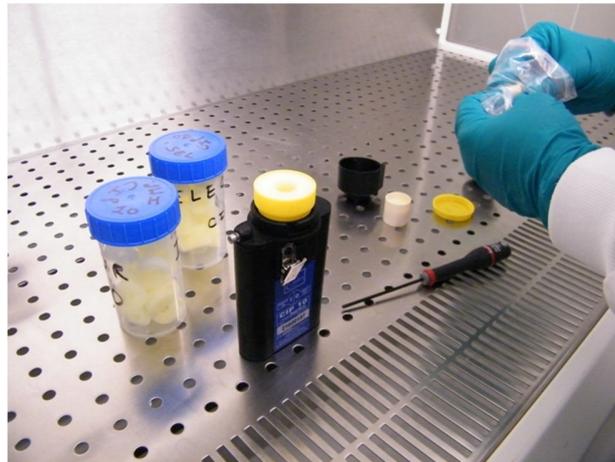
N° coupelle	4	1	6	7
Masse (g)	5,7556	5,7596	5,7573	5,7607

Préparation du CIP 10

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

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

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



Phase de prélèvement

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

Pesée des mousses après prélèvement

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

Tableau n° 18: Masses des coupelles mesurées avant prélèvement

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

2.3.2.4.3 Résultats obtenus

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

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

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

2.3.2.5 Validation du protocole dans deux haras

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

2.3.2.5.1 Choix du haras

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

2.3.2.5.2 Choix des surfaces

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

2.3.2.5.3 Choix du porteur du CIP

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

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

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



2.3.2.5.4 Résultats obtenus

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

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

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

2.3.2.5.5 Problèmes rencontrés

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

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

A : Il n'y a pas de poussière visible à l'œil nu au-dessus de la surface étudiée

B : Lorsque la surface étudiée est sollicitée par le cheval (mouvement et alimentation), de la poussière se dégage du sol

C : De la poussière se dégage du sol, sans que la surface soit sollicitée

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

2.3.2.5.6 Choix de quantification des poussières totales

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

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

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

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

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

Les mousses étaient identifiées comme suit :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4 PRÉLÈVEMENTS DE TERRE

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

2.4.1 Choix des profondeurs de prélèvement

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

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

2.4.2 Choix de la tarière

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

2.4.3 Protocole

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

Matériel :

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

Protocole :

Phase de prélèvement :

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

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



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



Phase de mise en culture :

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

2.4.4 Résultats obtenus sur les parcelles

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

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

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

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

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

2.5 RÉALISATION DE LA POLYMERASE CHAIN REACTION

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

2.5.1 Utilisation d'un protocole interne

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

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

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

Matériel :

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

Méthode :

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

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

Master Mix 2x: 12,5 μ l,

Rho1 (10 μ M): 1 μ l,

Rho2 (10 μ M): 1 μ l,

Eau: 8,5 μ l,

(ADN : 2 μ l),

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

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

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

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

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

Matériel :

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

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

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

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

Dépôt des échantillons :

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

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

Méthode :

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

2.5.2 Résultats obtenus avec une souche virulente de référence

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

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

