

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 9 avril 2018

## **AVIS**

### **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

**relatif aux méthodes de prévention et de lutte  
contre la rhodococcose du poulain.**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont publiés sur son site internet.*

---

L'Anses a été saisie le 3 mars 2017 par l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) pour la réalisation de l'expertise suivante : « Méthodes de prévention et de lutte contre la rhodococcose du poulain ».

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

La rhodococcose est une maladie bactérienne respiratoire sévissant chez le poulain et ayant de graves conséquences, car elle induit un taux de létalité d'environ 80% en l'absence de traitement, le seul traitement aujourd'hui disponible étant une association de rifampicine (antibiotique critique) et d'un macrolide.

Cette maladie n'étant pas une maladie catégorisée (catégorie 1 ou 2), sa gestion ainsi que l'amélioration des connaissances sur cette maladie, par la recherche, relèvent de l'initiative des filières équinées.

Afin d'être en mesure de consacrer ses fonds de recherche de façon pertinente à la lutte contre cette maladie, l'IFCE saisit l'Anses pour qu'une expertise soit réalisée sur l'état des connaissances scientifiques sur les moyens de prévention et de lutte et sur les préconisations de recherche en la matière

La présente saisine a donc pour double objectif :

- de réaliser un état des connaissances scientifiques sur la maladie et sur les moyens de prévention et de lutte
- d'élaborer des recommandations de recherches permettant d'améliorer ces connaissances et/ou d'améliorer la mise en œuvre des méthodes disponibles.

## 2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été confiée au comité d'experts spécialisé (CES) « Santé et bien-être des animaux » (SABA), qui a construit son analyse et ses conclusions sur la base d'un rapport initial rédigé par cinq rapporteurs. Le CES SABA a validé l'analyse et les conclusions de cette saisine lors de sa réunion du 8 mars 2018.

Dans le cadre de leurs travaux, les rapporteurs ont auditionné les demandeurs de la saisine, des représentants des professionnels de la filière équine ainsi que les deux laboratoires français autorisés à fabriquer des auto-vaccins contre la rhodococcose équine (cf annexe 1).

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

## 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

La rhodococcose est une maladie infectieuse causée par la bactérie *Rhodococcus equi* (ou *Prescottia equi*). Elle affecte des espèces animales variées, en particulier les équidés, et l'Homme.

Chez les équidés, elle affecte essentiellement le poulain âgé de 3 semaines à 6 mois (le plus souvent vers 2 mois), chez lequel la forme la plus fréquente et la plus caractéristique est une bronchopneumonie pyogranulomateuse, d'évolution subaiguë ou chronique, caractérisée par le développement d'abcès pulmonaires dont la taille et le nombre sont en relation avec la gravité de l'atteinte clinique et le pronostic. Il s'agit d'une maladie insidieuse, dont les signes cliniques se manifestent alors que les lésions pulmonaires sont déjà bien développées (Giguere *et al.* 2011). Des formes extrapulmonaires sont aussi décrites, associées ou non à la forme pulmonaire : les plus communes sont intestinales (diarrhée, entérotyphlocolite ulcéral), ostéo-articulaires (synovites, arthrites et/ou ostéomyélites), intra-abdominales (lymphadénite, abcès) et oculaires (uvéite) (Cohen 2014b). La maladie (avec des localisations similaires) est, en revanche, assez rare chez les chevaux adultes chez lesquels elle est généralement le fait d'une immunodépression ou d'affections intercurrentes (Freestone *et al.* 1987). La rhodococcose ne se limite pas aux seuls équidés (Vázquez-Boland *et al.* 2013). Elle est communément associée à une lymphadénite granulomateuse des nœuds lymphatiques cervicaux et sous-maxillaires chez le porc ou le sanglier. Elle est également décrite chez les bovins et les petits ruminants, notamment la chèvre et, occasionnellement, le chien et le chat. Considérée comme une zoonose potentielle émergente par certains auteurs, la rhodococcose peut enfin affecter l'Homme, mais se développe essentiellement chez des sujets immunodéprimés (SIDA, lymphomes, leucémies, cancers pulmonaires...) ou sous traitement immunodépresseur, la forme principale étant dans ce cas une pneumonie.

Il faut noter que la rhodococcose équine est provoquée spécifiquement par des souches hébergeant un plasmide de virulence contenant le gène *vapA* codant pour une lipoprotéine VapA exprimée à la surface de la bactérie et lui conférant la capacité d'échapper à la phagocytose et de se répliquer à l'intérieur des cellules cibles (cf. chapitre suivant).

### 3.1. Connaissances sur l'agent pathogène

L'agent pathogène fut décrit pour la première fois en 1923 par Magnusson sous la dénomination de *Corynebacterium equi*, après caractérisation d'un isolat issu du poumon d'un poulain atteint d'une pneumonie pyogranulomateuse, puis reclassée comme *Rhodococcus equi* en 1977. Une proposition de reclassement dans un nouveau genre sous la dénomination de *Prescottia equi comb. nov.* a été formulée en 2013 (Jones, Sutcliffe, et Goodfellow 2013), mais c'est la dénomination *R. equi* qui prévaut toujours actuellement.

Cette bactérie, comme les bactéries des genres *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Gordonia* avec lesquels elle possède certaines similitudes, notamment la possession d'acides mycoliques, appartient à la famille des *Nocardiaceae* au sein de l'ordre des *Corynebacteriales*. C'est une bactérie assez polymorphe (apparaissant, selon les conditions et la phase de croissance, sous forme coccobacillaire, bacillaire ou filamenteuse) à Gram positif et partiellement acido-résistante, capsulée, non mobile, non sporulante, aérobie stricte. *In vitro*, sa température optimale de croissance est de 30°C (la croissance est plus faible à 37°C, et s'interrompt à 10°C), pour un pH compris entre 7 et 7,5 (elle se développe bien, néanmoins, à des pH compris entre 6 et 9) (Hughes et Sulaiman 1987).

*R. equi* cultive aisément sur les milieux d'usage courant, produisant sur milieu gélosé des colonies muqueuses se pigmentant progressivement en orange ou rose saumon. Il est aisément identifiable après culture sur la base de ses caractères morphologiques, culturels et biochimiques.

La structure chimique de *R. equi* est bien connue. Cette bactérie se caractérise notamment :

- par une enveloppe cellulaire riche en lipides contenant notamment un acide mycolique typique dont les chaînes sont incorporées à des glycolipides et liées de façon covalente au peptidoglycane-arabinogalactane constituant le squelette bactérien pariétal (Sydor *et al.* 2013) ;
- par une capsule polysaccharidique (à l'origine du caractère mucoïde des colonies bactériennes) dont les propriétés antigéniques permettent de distinguer, parmi les souches de *R. equi*, 27 sérotypes capsulaires (Prescott 1991) ;
- par la présence de pili (2 à 4 par cellule bactérienne) aux propriétés cyto-adhésives incriminés dans l'attachement aux cellules épithéliales et aux macrophages (Letek *et al.* 2010, Vázquez-Boland *et al.* 2013) ;
- par la présence à leur surface et/ou la sécrétion, exclusivement chez les souches virulentes, de protéines dite Vap pour « virulence-associated protein » de 17-20 kDa et 164-202 acides aminés (Letek *et al.* 2008, Vázquez-Boland *et al.* 2013). Parmi celles-ci, la lipoprotéine dite VapA représente le facteur essentiel de virulence pour les poulains infectés et un marqueur immunodominant de l'infection (impliqué dans l'immunisation des équidés et la production de sérums hyperimmuns). Exclusive chez les équidés, cette protéine de virulence est remplacée dans les souches impliquées dans la maladie chez le porc par une lipoprotéine distincte VapB, et chez les bovins par une protéine VapN (Vázquez-Boland *et al.* 2013).

*R. equi*, dont le génome a été entièrement séquencé, constitue une espèce bactérienne génétiquement homogène. Pour la souche 103S d'origine équine séquencée, ce génome consiste en un chromosome circulaire de 5 043 170 paires de bases avec 4 525 gènes probables et un grand plasmide circulaire conjugatif « pVAP » (ici pVAPA) de 80 610 paires de bases contenant 73 gènes probables, responsable de la virulence chez le poulain (Letek *et al.* 2008). D'autres plasmides, aux fonctions inconnues, sont également identifiés chez une partie des isolats (Duquesne *et al.*, 2010). Les gènes impliqués dans la production des facteurs de virulence sont identifiés dans le pVAP (pour les plus importants) et dans le chromosome bactérien.

- Le pVAP, dont plusieurs copies peuvent être hébergées dans une cellule bactérienne, joue un rôle clef dans le pouvoir pathogène. Les souches sans pVAP sont considérées comme non virulentes.

Trois types de plasmides sont reconnus selon l'espèce hôte : le pVAPA, dit aussi « plasmide équin », caractérise les souches virulentes isolées dans les lésions chez les équidés ; ces souches diffèrent des souches isolées de lésions chez le porc, caractérisées par la présence du pVAPB (« plasmide porcin ») et de celles isolées de lésions chez les bovins, qui hébergent un troisième type de plasmide « non-A non-B », dit pVAPN (qui, en fait, à la différence des pVAPA et B, est un réplicon linéaire) (Ocampo-Sosa *et al.* 2007, Vázquez-Boland *et al.* 2013). L'association respective de ces trois types de plasmides de virulence avec les équins, porcins et bovins suggère une forte sélection liée à l'hôte permettant l'acquisition du type de plasmide correspondant par les souches (non virulentes) qui en sont dépourvues (Vázquez-Boland *et al.* 2013). Les isolats humains peuvent, en revanche, appartenir à ces différents types plasmidiques, ou être parfois dépourvus de plasmide. Nous évoquerons uniquement ici, compte tenu du sujet traité, les caractéristiques du pVAPA. Ce plasmide (85 à 90 kb), typiquement associé aux souches pathogènes équines réunit 4 groupes de gènes : un groupe correspondant aux gènes *vap* réunis dans l'îlot de pathogénicité (PAI), un groupe de gènes impliqués dans la réplication du plasmide, un groupe impliqué dans la conjugaison (dont le gène *traA*) et un groupe de gènes dont la fonction demeure inconnue. Neuf gènes (et pseudogènes) *vap* sont caractérisés dans le PAI : *vapA*, -C, -D, -E, -G, -H, ainsi que les pseudogènes *vapF*, -I et -X, auxquels s'ajoutent notamment des gènes (tels que *virR* et *virS*) régulant leur transcription (Letek *et al.* 2008, Vázquez-Boland *et al.* 2013). Les mutants délétés *vapA*- perdent leur virulence, soulignant l'importance de ce gène. Le rôle spécifique des autres gènes *vap* demeure inconnu (Letek *et al.* 2008). L'expression des gènes *vap* est induite par des températures supérieures à 32°C, un faible pH, un stress oxydatif et/ou de faibles concentrations en cations divalents tels que Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> (Von Bargen et Haas 2009), conditions qui sont rencontrées *in vivo*, par exemple dans le phagosome des macrophages (Ren et Prescott 2003). *In vitro*, la culture de *R. equi* à 37°C entraîne aisément la perte du pVapA, conséquence d'une surexpression, à cette température, des gènes de virulence, d'où l'importance de la culture à 30°C, cette température induisant généralement une régulation négative de l'expression des gènes *vap* (Letek *et al.* 2010, Takai *et al.* 1992). L'analyse des profils RFLP (« Restriction Fragment Length Polymorphism ») obtenus après digestion de l'ADN plasmidique par des endonucléases de restriction permet de distinguer 12 types parmi les isolats équins : 4 types (I à IV) de 85 kb, 3 (I à III) de 87 kb et 5 types (I à V) de 90 kb (Venner *et al.* 2007). Ces types ne sont pas répartis uniformément dans le monde : les types les plus fréquemment isolés chez des poulains malades en Europe sont des plasmides du type 85 kb I (le plus fréquent) et du type 87 kb I. Le type 85 kb II a été identifié seulement chez des isolats français. Ces 3 types correspondent aux types plasmidiques identifiés en Basse-Normandie (Duquesne *et al.* 2010, Petry *et al.* 2017).

- L'intervention d'éventuels facteurs de virulence codés par des gènes chromosomiques est également suspectée ou caractérisée (Letek *et al.* 2010, Prescott 1991, von Bargen *et al.* 2009). C'est le cas notamment d'exo-enzymes (dénommés « equi factors ») comme des cholestérol-oxydases et une phospholipase, de l'acide mycolique (incriminé dans la formation de granulomes), de l'exopolysaccharide capsulaire et des pili. Les gènes codant pour la capsule et les pili cytoadhésifs sont localisés dans des îlots génomiques HGT (« horizontal gene transfer »). Il faut souligner également les interrelations entre le pVapA et de nombreux gènes chromosomiques (68 %), l'activation des gènes de virulence (observée par exemple *in vitro* à 37°C, pH 6,5) provoquant une sur-régulation des gènes chromosomiques (Letek *et al.* 2010). Quelques études ont été menées afin de

comparer, d'un point de vue génétique, les souches isolées chez les équidés malades ou leur environnement. Ainsi, des analyses électrophorétiques en champ pulsé (PFGE) de l'ADN chromosomique révèlent que plusieurs pulsotypes peuvent être différenciés au sein des souches appartenant à un même type plasmidique identifiées dans une exploitation donnée (Venner *et al.* 2007). Des analyses MLST (« Multilocus Sequence Typing ») ont été aussi réalisées (Duquesne *et al.* 2017), différenciant différents ST (« Sequence Type ») au sein d'un même type plasmidique parmi les souches isolées d'une exploitation à l'autre, dans une même exploitation, voire chez un même poulain. Aucune recherche n'a eu lieu jusqu'ici pour tenter d'établir une relation entre certains pulsotypes ou certains ST et la virulence des souches.

*R. equi* a la particularité d'être une **bactérie ubiquiste à la fois saprophyte du sol et pathogène opportuniste multi-hôtes** chez lesquels elle se comporte en parasite intracellulaire facultatif.

- En tant que bactérie saprophyte du sol, *R. equi* dispose d'un important équipement enzymatique lui conférant la capacité de s'adapter à des substrats variés et de survivre dans des milieux pauvres en nutriments. Il tolère une large gamme de pH, acide (un pH 4 est bactériostatique, mais un pH inférieur est nécessaire pour son inactivation, de l'ordre de 2,5 à 3) ou alcalin (entre 8,5 et 10) (Benoit *et al.* 2000, Letek *et al.* 2010). Sa croissance dans le sol est facilitée par la présence de fèces et fumiers d'herbivores, en rapport avec leur richesse en acides gras (Barton et Hughes 1984, Prescott 1987) produits lors de la dégradation des hydrates de carbone par le microbiote intestinal (Letek *et al.* 2010). En effet, *R. equi*, qui est dépourvu de système de phospho-transférases (PTS) des glucides (Anastasi *et al.* 2016, Letek *et al.* 2010), utilise principalement comme sources de carbone des acides organiques (acétate, lactate, butyrate, etc.) et des acides gras. Il s'avère également que les lipides constituent le principal substrat de croissance *in vivo* (Letek *et al.* 2010).

*R. equi* possède, par ailleurs, une bonne tolérance à la dessiccation et au stress oxydatif. Cette tolérance est importante pour expliquer sa survie dans des sols secs et sa transmission par des poussières aérosolisées (Vázquez-Boland *et al.* 2013). La protection contre la déshydratation dans l'environnement naturel de la bactérie serait notamment conférée par la capsule, qui pourrait ainsi représenter un facteur de la transmission (Vázquez-Boland *et al.* 2013).

- Comme expliqué précédemment, le caractère pathogène de *R. equi* chez le poulain est strictement associé à l'acquisition par la bactérie du pVAPA. Ces souches inhalées par les poulains et phagocytées par les macrophages alvéolaires ont la capacité, suite à l'expression des gènes *vap* et la production des protéines correspondantes, notamment la protéine VapA, de bloquer la maturation du phagosome et d'empêcher la fusion phagosome-lysosome, permettant à la bactérie non seulement de survivre, mais également d'y proliférer, entraînant la nécrose et la mort cellulaire (Prescott 1991, Von Bargen et Haas 2009). Les souches dépourvues du plasmide de virulence sont, en revanche, détruites par les macrophages, et en tout cas rapidement éliminées de l'appareil respiratoire. La virulence des souches peut être étudiée *in vitro* sur cultures de macrophages circulants ou alvéolaires, ou *in vivo* en utilisant notamment un modèle souris (après inoculation IV ou intra-nasale), la reproduction expérimentale de la maladie chez le poulain étant difficilement utilisable en pratique (González-Iglesias *et al.* 2014, Von Bargen et Haas 2009). De telles études montrent en particulier que si une simple délétion du gène *vapA* entraîne toujours la perte de la virulence de la souche (Jain, Bloom, et Hondalus 2003), l'introduction de ce seul gène est insuffisante pour restaurer la virulence, montrant que d'autres gènes du plasmide et, sans doute, du chromosome participent à la virulence. Le modèle murin a également été utilisé pour étudier certains aspects de la réponse immunitaire induite par *R. equi* et tester l'efficacité de certains

candidats vaccins. Toutefois, l'extrapolation à l'espèce équine des résultats obtenus chez la souris doit être envisagée avec précaution.

Enfin la localisation intracellulaire de *R. equi* et la possession de nombreux déterminants de résistance aux antibiotiques chromosomiques ( $\beta$ -lactamases, aminoglycoside phosphotransférases, pompes à efflux) (Letek *et al.* 2010) expliquent les difficultés rencontrées pour traiter la maladie du fait de la perte de sensibilité *in vivo* de nombreux antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, sulfamides, quinolones, tétracyclines, clindamycine, et chloramphénicol).

## 3.2. Epidémiologie de la maladie, facteurs de risque et mesures sanitaires

### 3.2.1. Etat des connaissances

#### 3.2.1.1. Epidémiologie descriptive

Maladie cosmopolite, la rhodococcose équine constitue un problème infectieux majeur chez les poulains de moins de 6 mois. L'incidence et la prévalence rapportées peuvent varier selon les études en fonction du critère de détection utilisé : en effet, le nombre de poulains exprimant cliniquement une pneumonie est inférieur au nombre de poulains porteurs de lésions détectées par échographie pulmonaire (Cohen 2014b).

La maladie peut s'exprimer sous forme sporadique dans certains élevages, généralement de faible taille, ou enzootique dans d'autres, notamment ceux de grande taille où la proportion de poulains malades, plus importante, peut dépasser 20 % (Cohen 2009). Certains vétérinaires indiquent avoir parfois observé que des poulains nés de certaines juments sont fréquemment touchés par la maladie alors que ceux nés d'autres juments dans le même environnement ne développent pas de pneumonie (McQueen *et al.* 2015).

La rhodococcose équine est présente dans toutes les régions en France, où elle affecte de plus en plus d'élevages. Des études, menées en Basse-Normandie, ont montré une prévalence de 1,2% (Tapprest *et al.* 2006) ; *R. equi* représentait plus de 25 % des causes de mortalité enregistrées à l'autopsie chez les poulains âgés de 1 à 6 mois (Tapprest *et al.* 2008), la maladie étant plus fréquente, souvent enzootique, dans les élevages les plus importants (en termes de naissances de poulains), notamment en cas de naissances tardives (Tapprest *et al.* 2011). Le taux de létalité peut être très important et atteindre plus de 80% en l'absence de soins des animaux les plus malades.

Toutes les races équinnes sont affectées. Une plus forte prévalence observée parmi les trotteurs français par rapport aux Pur-Sang et aux Selle Français refléterait des pratiques d'élevage différentes, et notamment des tailles d'élevage plus importantes (Collobert *et al.* 1998).

#### 3.2.1.2. Epidémiologie analytique

##### 1. Sources d'infection

*R. equi* est une **bactérie tellurique opportuniste communément isolée du sol** des enclos, chemins et herbages. Elle peut être cultivée à partir d'échantillons de sol prélevés en surface (où la quantité bactérienne est la plus importante) et jusqu'à une trentaine de cm de profondeur (la quantité bactérienne est cependant moins importante, 100 fois plus faible à 30 cm de profondeur qu'en surface (Takai *et al.* 1987). Elle s'y multiplie, en particulier lorsque les conditions de pH, de température et d'humidité sont favorables à sa croissance, favorisée notamment par la présence d'acides organiques (en particulier acétate et propionate) apportés par les matières fécales ou le fumier des herbivores (Hughes et Sulaiman 1987,

Prescott 1991, Takai, Kawazu, et Tsubaki 1986, Takai *et al.* 1997, Barton et Hughes 1982). A cet égard, la présence de crottins est un facteur d'enrichissement du sol qui contribue à la survie de la bactérie et permet sa multiplication (y compris dans un substrat initialement pauvre en nutriments, comme le sable) (Hughes et Sulaiman 1987). Les souches hébergeant le pVAPA, pathogènes pour les équidés, sont notamment isolées dans le sol des élevages équins infectés, où elles coexistent avec des souches non virulentes (Stoughton *et al.* 2013). Selon certaines études, la proportion de souches virulentes est significativement plus élevée dans les sols des élevages dans lesquels la rhodococcose apparaît de façon récurrente que dans celui des élevages sans historique de maladie (Takai, Sekizaki, *et al.* 1991). Petry *et al.*, 2017 La bactérie est aussi isolée dans les poussières (paddocks, chemins) et dans l'air et les poussières des locaux d'élevages (stalles) hébergeant les mères et leur poulain durant la saison de poulinage (Cohen *et al.* 2012), et avec des concentrations de souches virulentes plus élevées dans les stalles où ont séjourné des poulains ayant développé la maladie (Cohen *et al.* 2013). Le nombre de bactéries isolées dans l'air augmente en saison chaude, notamment durant les périodes sèches et ventées (Takai *et al.* 1987). La mise en suspension de la bactérie dans l'air est facilitée par l'état du sol (sol peu humide, sablonneux, sans couvert végétal) (Muscatello, Anderson, *et al.* 2006).

*R. equi* (souches hébergeant ou non un plasmide de virulence) est aussi présent dans le **contenu intestinal de diverses espèces animales** (Prescott 1991), notamment des chevaux, jeunes ou adultes. Ces animaux contribuent, par leurs fèces et les fumiers contaminés, à la diffusion de l'infection. Les adultes deviennent porteurs sains s'ils séjournent dans un environnement contaminé, où ils ingèrent la bactérie en broutant (Hughes et Sulaiman 1987). Il n'a pas été démontré, cependant, que la bactérie se multiplie dans l'intestin des chevaux adultes (du fait, semble-t-il, des conditions d'anaérobiose), où sa concentration moyenne, mesurée dans les crottins, atteint  $10^2$  à  $10^3$  UFC/g. La bactérie se multiplie, en revanche, dans l'intestin des poulains, où elle est isolée dès les premières semaines de vie jusqu'à l'âge de 8 à 10 semaines, atteignant des concentrations moyennes dans les crottins de  $10^4$  à  $10^5$  UFC/g. La multiplication cesse vers 8 semaines et les concentrations se réduisent ensuite progressivement pour se stabiliser à des niveaux équivalents à ceux trouvés chez les adultes (Takai 1997). Les concentrations les plus élevées sont mesurées chez les poulains atteints de pneumonie, qui peuvent éliminer  $10^6$  à  $10^8$  UFC/g de crottin. La proportion de souches virulentes (hébergeant le plasmide VAPA) est élevée chez les poulains, atteignant éventuellement plus de 60 % des isolats fécaux chez des sujets apparemment sains séjournant dans les élevages à forte incidence d'infection (Takai, Ohbushi, *et al.* 1991). La déglutition d'une grande quantité de bactéries expectorées chez les poulains atteints de bronchopneumonie aiguë ou chronique contribue à l'enrichissement du contenu intestinal en souches virulentes.

Ces données reflètent un **cycle sol-animal** (Hughes et Sulaiman 1987) qui contribue à l'enrichissement progressif en bactéries virulentes de l'environnement de certains élevages, notamment en présence de poulains atteints de pneumonie qui, excréant dans leurs crottins de grandes quantités de souches virulentes, sont ainsi considérés comme la source majeure de souches virulentes et contribuent à l'amplification progressive de l'infection dans les élevages dans lesquels la maladie est observée (Takai 1997). Un enrichissement progressif ou le maintien des bactéries virulentes dans l'environnement des exploitations infectées seraient facilités par l'efficacité du transfert par conjugaison du plasmide de virulence depuis les souches virulentes issues des animaux infectés vers les souches environnementales sans plasmide (Tripathi *et al.* 2012, Vázquez-Boland *et al.* 2013).

## 2. Modes de contamination

La transmission de l'agent de la rhodococcose équine est essentiellement indirecte, les voies de contamination étant digestive et respiratoire. La contamination de plaies, possible chez les équidés exposés à un environnement contaminé, est d'importance mineure. Une

transmission directe par aérosol de poulain à poulain a été aussi envisagée comme alternative à la contamination par aérosol d'origine environnementale (Muscatello, Gilkerson, et Browning 2009).

La présence de *R. equi* virulents dans l'intestin des chevaux adultes témoigne de la réalité de la contamination par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. La voie digestive contribue aussi à la contamination des poulains dans les premières semaines de vie et au développement de cas d'infection subclinique (Yager 1987), mais ne permet pas, expérimentalement, d'induire des lésions pulmonaires (Johnson, Prescott, et Markham 1983). D'ailleurs, les lésions intestinales observées chez les poulains sont souvent secondaires aux lésions pulmonaires et en relation avec la déglutition de quantités importantes de bactéries virulentes (Yager 1987). Néanmoins, les concentrations et les proportions de bactéries virulentes bactériennes dans le sol n'en sont pas pour autant corrélées avec la prévalence des cas de pneumonie chez les poulains (Cohen *et al.* 2008, Martens *et al.* 2000, Muscatello, Anderson, *et al.* 2006), suggérant l'intervention d'autres paramètres, en particulier la capacité d'aérosolisation des souches virulentes dans l'épidémiologie de la rhodococcose équine (Muscatello, Anderson, *et al.* 2006).

La voie respiratoire est en définitive la voie principale de contamination associée au développement des lésions pulmonaires chez les poulains (Muscatello 2012). L'inoculation de souches VapA par voie bronchique ou par aérosol est d'ailleurs le seul moyen permettant d'induire expérimentalement des lésions pulmonaires identiques à celles observées dans les cas d'infection naturelle (Johnson, Prescott, et Markham 1983, Sanz *et al.* 2013, Martens, Fiske, et Renshaw 1982). Plusieurs études montrent, en outre, que la concentration en souches virulentes dans l'air est positivement associée avec la prévalence des cas de pneumonie chez les poulains dans les élevages, notamment lorsque les poulains sont exposés à des fortes concentrations durant les deux premières semaines après leur naissance (Cohen *et al.* 2013, Kuskie *et al.* 2011, Muscatello, Anderson, *et al.* 2006).

### 3. Facteurs de sensibilité

Sensibilité et résistance des équidés à la rhodococcose sont dépendant de l'âge. En effet, les poulains de moins de 6 mois peuvent être malades contrairement aux yearlings et aux chevaux plus âgés. La maladie, lorsqu'elle apparaît chez ces derniers, est associée à une immunodépression ou une affection intercurrente (Cohen 2009).

La plus grande sensibilité du poulain à la suite de son infection en période néonatale est démontrée par les études épidémiologiques (Cohen *et al.* 2013, Horowitz *et al.* 2001, Kuskie *et al.* 2011, Muscatello, Anderson, *et al.* 2006) et expérimentales (Sanz *et al.* 2013). Les conséquences de l'infection dépendent aussi de la dose virulente, des doses relativement faibles ( $10^2$  UFC) permettant de reproduire expérimentalement (inoculation par voie intra-trachéale) des lésions pyogranulomateuses d'évolution lente non associées à une expression clinique et régressant spontanément, analogues à celles décrites dans les élevages à forte prévalence d'infection, alors que des doses plus fortes ( $10^4$  à  $10^5$  UFC) provoquent des pneumonies aiguës graves (Sanz *et al.* 2013).

En dehors de l'influence des facteurs inhérents à la bactérie et l'environnement, la sensibilité du poulain est conditionnée, d'une part, par la qualité du transfert immunitaire passif (essentiellement colostral) d'origine maternelle, d'autre part, par sa capacité à développer précocement une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th1 spécifique de *R. equi* (Kristin M Patton *et al.* 2005) (*cf.* partie « Réponse immunitaire à l'infection par *R. equi* »). Toutefois, les facteurs agissant sur (ou interférant avec) les mécanismes immunitaires protecteurs ne sont pas encore totalement identifiés, qu'il s'agisse du développement de l'immunité consécutif à la multiplication précoce de la bactérie dans l'intestin du jeune poulain (éventuellement en rapport avec l'évolution du microbiome intestinal néonatal qui contribue au développement de l'immunité dans l'intestin) (Whitfield-Cargile *et al.* 2015) ou de celui des mécanismes de défense pulmonaire (Kristin M Patton *et al.* 2005). La plupart des cas de pneumonie chez le poulain surviennent entre 1 et 2 à 3 mois

d'âge, période durant laquelle l'immunité d'origine maternelle a chuté alors que sa propre immunité est encore insuffisamment développée.

Une possible prédisposition génétique a été aussi recherchée, notamment pour expliquer la sensibilité de certains poulains, et plusieurs études ont permis d'identifier des gènes d'intérêt potentiellement associés à la quantité de bactéries VapA mesurée dans les voies respiratoires des poulains infectés ou au développement d'une pneumonie chez ces animaux (Horin *et al.* 2010, McQueen *et al.* 2015). Il apparaît cependant que la sensibilité du poulain n'est pas contrôlée par un seul gène et qu'elle met en jeu des mécanismes complexes (modulation de l'expression des gènes) impliqués dans la réponse immunitaire, en particulier dans la réponse immunitaire innée (McQueen *et al.* 2016).

### 3.2.1.3. Epidémiologie synthétique, facteurs de risques

Le développement de la maladie chez le poulain découle de la convergence d'un ensemble de facteurs inhérents à la bactérie, aux poulains et à l'environnement contaminé dans lequel évoluent les animaux. Le risque envisagé correspond à celui du développement possible de la maladie (rhodococcose, s'exprimant notamment chez le poulain par une pneumonie cliniquement exprimée) chez les sujets infectés.

*R. equi* est une bactérie tellurique opportuniste dont le pouvoir pathogène pour les équidés est dû à l'acquisition d'un plasmide transférable par conjugaison, porteur du gène *vapA*. L'expression de ce gène déclenche la synthèse de la protéine A associée à la virulence, localisée à sa surface, qui permet à la bactérie, contrairement aux souches dépourvues (ou curées) du plasmide, de survivre à la phagocytose et de se multiplier dans les macrophages pulmonaires (Giguère *et al.* 1999). Plusieurs types de plasmides hébergeant le gène *vapA* sont identifiés, néanmoins cette diversité ne semble corrélée, ni avec des différences de virulence des souches, ni avec des différences de statut des élevages (Duquesne *et al.* 2010, Petry *et al.* 2017).

La majorité des équidés est exposée à *R. equi* en raison de son ubiquité dans l'environnement. En général, seuls les poulains sont sensibles, certains développant les formes pulmonaires graves. Trois paramètres principaux semblent se conjuguer pour conditionner cette évolution, la sensibilité propre à chaque individu, qui découle de la qualité du transfert immunitaire colostrale de la jument à son poulain et de ses propres capacités immunitaires (prédisposition génétique), l'âge auquel il est exposé à des aérosols (ou poussières) infectieux et la quantité de bactéries virulentes inhalées.

Les facteurs de risque d'ordre immunologique sont traités dans la partie du rapport consacrée à l'immunité.

Les facteurs de risque conditionnant l'âge d'exposition à des aérosols infectieux et la quantité de bactéries inhalées tiennent à l'environnement contaminé dans lequel évoluent les animaux. Il faut souligner néanmoins que ces facteurs de risque ressortent de façon variable, significative ou non, selon les études et selon les pays (qui diffèrent par leur environnement climatique, par exemple) d'investigation.

Le sol des pâtures est la source primaire de *R. equi*, la présence de la bactérie conditionnant la possibilité de contamination des équidés, jeunes ou adultes. Bien que la proportion de souches de *R. equi* virulentes isolées dans le sol puisse être significativement plus importante dans le sol des élevages régulièrement affectés (Takai, Sekizaki, *et al.* 1991) (Petry *et al.* 2017), ces souches n'en sont pas moins présentes dans la majorité des élevages et leur présence n'est pas corrélée avec la prévalence de la maladie (Martens *et al.* 2000, Muscatello, Anderson, *et al.* 2006). Une étude conduite au Texas et comparant les concentrations de divers composants chimiques (fer, zinc, magnésium...) dans les sols n'a pas permis de montrer des différences significatives entre exploitations atteintes ou non de

rhodococcose équine (Martens, Cohen, Chaffin, et Waskom 2002). Des résultats variés ont été cependant obtenus à propos du pH des sols. En effet, bien que la croissance de la bactérie soit plus importante pour des pH situés entre 7 et 8 (Hughes et Sulaiman, 1987), le fait que l'expression du gène *vapA* soit optimalement activée à pH 6,5 a conduit certains auteurs à suggérer qu'un pH légèrement acide pourrait favoriser la survie des souches virulentes dans le sol (Muscatello, Anderson, *et al.* 2006). Les investigations relatives à ce paramètre donnent des résultats variables. Contrairement à Martens *et al.* (étude réalisée aux Etats-Unis et publiée en 2002), Petry *et al.* (2017) ont pu observer en Basse-Normandie une association entre le pH des sols et, d'une part, la concentration des souches *vapA+*, d'autre part, le statut des élevages. Dans cette dernière étude, en effet, le pH d'échantillons de sols variait de 5,84 à 7,89 (médiane : 7,20 pour un IQR : 6,98-7,48) dans les exploitations affectées, contre 6,41 à 8,23 (médiane : 7,36 pour un IQR : 7,14-7,54) dans les exploitations non affectées (P valeur : 0,018). Il s'avère néanmoins que les facteurs qui influencent la survie et la multiplication des souches virulentes dans le sol demeurent hypothétiques (Muscatello, Anderson, *et al.* 2006), limitant les possibilités d'agir sur le sol pour réduire la quantité de souches virulentes. Les principales mesures jusqu'ici préconisées, sans qu'on ait pu réellement en étudier les effets, ont été des actions visant à corriger le pH du sol avec des apports de chaux. En revanche, l'apport et la présence de crottins dans le sol est un facteur important permettant non seulement la survie, mais surtout la multiplication de la bactérie dans le sol.

L'excrétion fécale des souches virulentes contribue de façon importante à la contamination environnementale des élevages équinés. Les crottins, en particulier ceux des poulains atteints de pneumonie, constituent une source importante de contamination dans les élevages, notamment des stalles où sont hébergés les juments et leurs poulains. En outre, le déplacement des animaux infectés et les transports de fèces et fumier sont des facteurs de diffusion géographique des bactéries, notamment des bactéries virulentes. Certains auteurs recommandent de retirer régulièrement les crottins pour limiter l'apport de souches virulentes dans l'environnement et réduire la prévalence de la maladie (Prescott, Travers, et Yager-Johnson 1984). Des études épidémiologiques, comparant des élevages enzootiquement affectés ou non, ont permis d'identifier plusieurs variables corrélées avec une plus forte incidence des pneumonies, en rapport notamment avec le nombre d'animaux (poulains en particulier) contribuant à l'enrichissement de l'environnement de l'élevage en bactéries virulentes : les principaux sont la superficie plus importante de l'établissement (Chaffin *et al.* 2003, Cohen, O'Connor, *et al.* 2005), un nombre plus élevé de poulains et/ou de couples juments-poulains résidents ou accueillis temporairement (Chaffin *et al.* 2003, Cohen *et al.* 2008). Des constatations analogues ressortent d'une étude récente en Basse Normandie (Tapprest *et al.* 2008, Tapprest *et al.* 2011) identifiant notamment comme à risque plus élevé de rhodococcose les élevages ayant plus de 15 naissances par an, une densité de chevaux par hectare supérieure à 1, un effectif de poulinières de passage supérieur ou égal à 20 et/ou une densité de couples mère-poulain supérieure à 2 couples/ha.

Le point dominant dans l'épidémiologie de la rhodococcose du poulain est cependant la corrélation entre la concentration en souches virulentes de l'air inhalé par les animaux et l'incidence des pneumonies (Muscatello, Anderson, *et al.* 2006). Bien que l'on ne puisse définir si cette association est une cause ou une conséquence de la présence de la rhodococcose dans les élevages enzootiquement affectés (Giguère *et al.* 2011), plusieurs études montrent néanmoins que l'exposition des poulains à un air contaminé, notamment dans les premières semaines après la naissance, augmente le risque qu'ils développent la maladie (Cohen *et al.* 2013, Kuskie *et al.* 2011, Muscatello, Anderson, *et al.* 2006). Par ailleurs, les poulains hébergés dans les stalles, dans lesquelles les concentrations en bactéries virulentes sont significativement plus élevées (Cohen *et al.* 2013, Kuskie *et al.* 2011), sont plus exposés que dans les paddocks, et les poulains nés et maintenus en pâture ont un risque plus faible de développer une pneumonie (Cohen 2009). Cependant, il convient de souligner que certains de ces résultats ont été obtenus en Irlande dont le climat doux et

humide limite les aérosols de poussières sur les pâtures, y compris pendant les mois d'été, ce qui induirait un risque plus élevé d'exposition à la bactérie dans les bâtiments (Muscatello, Gerbaud, *et al.* 2006). Plusieurs facteurs conditionnent la concentration de *R. equi* dans l'air, notamment la quantité d'animaux (permanents et de passage) hébergés, les caractéristiques du sol et les conditions climatiques. L'importance de la taille des effectifs présents et de la présence de poulains malades a été précédemment évoquée. Les caractéristiques du sol sont celles favorisant la mise en suspension des bactéries virulentes qui y sont présentes dans les paddocks, parcs, allées ou aires d'attente : sol peu humide (moins de 10% d'eau), à faible couverture herbeuse, sableux plutôt qu'argileux, poussiéreux, la concentration des bactéries dans l'air étant corrélée avec celle du sol (Muscatello, Anderson, *et al.* 2006). Un temps sec et chaud favorise, en outre, la capacité d'aérosolisation à partir de ces sols (Muscatello, Anderson, *et al.* 2006). Des constatations analogues ressortent de l'étude récente en Basse Normandie (Tapprest *et al.* 2011), mettant notamment l'accent, dans les élevages les plus infectés sur le sol des paddocks en sable ou en terre, le faible enherbement des paddocks, l'environnement poussiéreux et la mauvaise aération des logements des couples mères-poulains.

Cette étude identifie également les naissances tardives (en mai et/ou juin) en Basse Normandie comme facteur de risque majeur associé à l'apparition de cas de pneumonie, car entraînant la superposition de la saison chaude et sèche (facilitant l'aérosolisation des bactéries) à la période de sensibilité maximale des poulains à l'infection (entre 1 et 3 mois d'âge, l'immunité d'origine maternelle chute alors que l'immunité propre du poulain est encore insuffisamment développée) (Ferry et Tapprest 2012).

Toutes ces constatations sont à l'origine de pratiques d'élevage et de gestion de l'environnement visant à réduire l'exposition des poulains aux poussières virulentes. Elles doivent être associées à des mesures destinées à réduire leur sensibilité en attendant le développement de leur immunité vis-à-vis de *R. equi*.

### 3.2.2. Réponses aux questions

#### 3.2.2.1. Mesures de gestion sanitaire

Bien qu'aucune évaluation systématique de leur impact dans la réduction de la prévalence ou de l'incidence des cas de rhodococcose n'ait été conduite dans des élevages infectés de manière enzootique, des mesures de gestion sanitaire peuvent quand même être recommandées pour prévenir le développement de la maladie.

Les actions sanitaires à envisager sont celles qui contribuent à réduire l'exposition des poulains pendant leur période de sensibilité, c.-à-d. depuis leur naissance jusqu'à l'âge de 5 à 6 mois. Trois groupes de mesures peuvent être préconisées : réduire les possibilités d'aérosolisation des bactéries à l'origine de l'atteinte pulmonaire des poulains, la contamination des sols et des locaux, et la densité en animaux dans l'élevage. Il faut rappeler que les mesures proposées sont complémentaires, car agissant sur des paramètres étroitement dépendants les uns des autres.

#### 1. Réduire les possibilités d'aérosolisation des bactéries

Cet objectif de gestion se justifie par la constatation que le développement des lésions pulmonaires chez les poulains découle principalement de l'inhalation par ces derniers d'aérosols ou de poussières chargés en bactéries virulentes (VapA+) (Muscatello 2012). Les actions proposées (elles ne sont pas classées par ordre d'importance) sont destinées à limiter la contamination de l'air dans les locaux et la formation de poussières dans les zones à risque :

- ✓ veiller à une bonne ventilation des écuries et autres locaux d'hébergement des poulains (Cohen, Chaffin, et Martens 2002, Ferry et Tapprest 2012, Giguère et Prescott 1997) ;
- ✓ assainir les écuries, boxes et stabulations par un nettoyage soigneux (Cohen, Chaffin, et Martens 2000, Muscatello 2012) avec notamment un nettoyage à haute pression des sols et des murs suivi d'une désinfection (désinfectants phénoliques ou ammoniums quaternaires) (Ferry et Baradeau 2010) ;
- ✓ dépoussiérer et nettoyer régulièrement les couloirs de service et les abords de certaines installations comme les zones d'examen et d'insémination des juments (aspirateur industriel, nettoyage haut pression) (Ferry et Baradeau 2010) ;
- ✓ sortir les poulains des locaux d'hébergement chaque fois qu'ils sont vidés et nettoyés afin d'éviter l'exposition à la poussière contenue dans la litière ;
- ✓ dans les élevages où l'exposition infectieuse se produit principalement dans les écuries, privilégier, lorsque cela est possible, les naissances à l'herbage ;
- ✓ éviter les paddocks en sable (Tapprest *et al.* 2011) ;
- ✓ irriguer de façon intensive les aires dénudées et poussiéreuses dans les paddocks et pâtures, ainsi que toutes les voies de passage, les zones d'attente et de piétinement des chevaux (entrées de paddock, aires à proximité des mangeoires, abreuvoirs extérieurs, parcs à poulains ...) (Cohen, Chaffin, et Martens 2000, Giguère *et al.* 2011) (Muscatello 2012) ;
- ✓ maintenir une bonne couverture végétale sur les surfaces occupées par les poulains, en pratiquant par exemple des rotations de parcelles en fonction de la hauteur d'herbe (Cohen, Chaffin, et Martens 2002, Ferry et Baradeau 2010) ;
- ✓ changer de place régulièrement les bacs d'abreuvement et les mangeoires (Ferry 2017)
- ✓ réduire la densité des couples juments-poulains afin notamment de limiter la destruction du couvert végétal dans les zones où les animaux vont se regrouper spontanément (abreuvoirs, zones ombragées en période chaude...) (Cohen, Chaffin, et Martens 2002, Giguère *et al.* 2011, Muscatello 2012, Prescott et Hoffman 1993) ;
- ✓ une rotation régulière des parcelles est aussi un moyen proposé pour limiter la contamination fécale des sols, ainsi que le fait de déplacer régulièrement les points d'abreuvement qui, en y favorisant le rassemblement des chevaux, entraîne localement une concentration des déjections, et par les piétinements en période sèche l'émission de poussières contaminées.

## 2. Réduire la contamination bactérienne des sols et des locaux

Une réduction de la contamination des sols et des locaux par des souches (VapA +) virulentes peut être recherchée en agissant sur les animaux excréteurs, leurs déjections et les sols. Les actions proposées (elles ne sont pas classées par ordre d'importance) sont les suivantes :

- ✓ isoler les poulains malades (Muscatello 2012) dans des locaux séparés et aisés à nettoyer et désinfecter ;
- ✓ même s'il n'a pas été démontré que cette mesure pouvait prévenir l'introduction et la transmission de bactéries virulentes et l'apparition de cas de pneumonie, certains auteurs conseillent de séparer les couples jument/poulain résidents de ceux qui sont de passage, compte-tenu qu'il s'agit d'une mesure utile pour le contrôle des maladies infectieuses en général (Cohen, Chaffin, et Martens 2000, Cohen, Chaffin, et Martens 2002).
- ✓ procéder à l'enlèvement quotidien des crottins dans les écuries et les paddocks (Cohen, Chaffin, et Martens 2000, Muscatello 2012, Prescott et Hoffman 1993) (Prescott 1987) ;

- ✓ stocker les fumiers à l'écart des zones accessibles aux chevaux ;
- ✓ procéder à un compostage des crottins, notamment de ceux des poulains malades (Giguère *et al.* 2011) et éviter d'épandre ce compost sur les herbages car, même si *R. equi* a été détruit, la richesse en acides gras volatils du compost facilitera la multiplication des bactéries présentes dans le sol (Hughes et Sulaiman 1987) (Muscatello 2012) ;
- ✓ bien que des auteurs aient parfois émis des doutes quant à l'efficacité de cette mesure (Martens, Cohen, Chaffin, et Waskom 2002), corriger l'acidité des sols en pratiquant le chaulage de façon contrôlée (analyse de sol préalable) avant la mise à l'herbe et en respectant des conditions climatiques adaptées (sol humide et absence de pluie dans les 72 heures après l'épandage)<sup>1</sup>. Des recherches bactériologiques effectuées à la demande des haras nationaux sur des échantillons de sols (présentant initialement un pH de 5,4 à 6,2 et contenant des souches de *R. equi* virulentes) ont effectivement montré que des parcelles se révélaient négatives 1 mois après leur chaulage. (Ferry et Baradeau 2010, Ferry 2017). Il est impossible néanmoins, en l'absence d'investigations plus poussées, de déterminer si ces résultats découlent d'une élévation du pH des sols ou témoignent de la destruction des bactéries en surface du fait de l'effet thermique provoqué par l'application de la chaux vive.
- ✓ pratiquer un labour d'automne profond (Ferry et Baradeau 2010) suivi d'un semis (Cohen, Chaffin, et Martens 2002).

### 3. Réduire la densité en animaux

La plupart des enquêtes visant à comparer des élevages avec ou sans historique de rhodococcose montrent que les premiers sont généralement des élevages de plus grande taille, hébergeant plus de couples mère-poulain résidents ou de passage, et comptabilisant plus de naissances. Des chiffres sont avancés, par exemple, en Basse-Normandie (Tapprest *et al.* 2011), les élevages avec plus de 15 naissances par an et un effectif de poulinières de passage supérieur ou égal à 20, qui peuvent être utilisés pour identifier les établissements les plus à risque. Une réduction des effectifs et des naissances peut être une solution à envisager dans les élevages atteints, en l'associant aux mesures précédemment déclinées.

### 4. Une programmation des naissances en hiver

Les poulains nés tôt dans l'année (janvier-février) sont confrontés, à l'âge où leur sensibilité à la maladie est maximale (1-2 mois), à une exposition infectieuse d'origine environnementale faible et inversement, leur résistance s'est accrue lorsque surviennent les mois d'été chauds et secs qui constituent la principale période de risque.

Afin de réduire l'incidence des cas de rhodococcose, il est donc recommandé de faire saillir ou d'inséminer les juments le plus tôt possible dans l'année, de manière à obtenir des poulinages pendant les mois d'hiver (Giguère et Prescott 1997, Prescott et Hoffman 1993, Tapprest *et al.* 2011).

#### 3.2.2.2. Autres mesures de prévention

### 1. Préserver un bon état de santé et une bonne immunité du poulain, notamment aux périodes à risque

Deux types de mesures peuvent être recommandés pour réduire la sensibilité du poulain :

- Le contrôle du transfert d'immunité passive d'origine colostrale

---

<sup>1</sup> Mieux faire face à la rhodococcose du poulain. FERRY, B. IFCE 2017  
<http://www.ifce.fr/wp-content/uploads/2017/04/DIFF-Webconf-BF-rhodo-poulain.pdf>

Le transfert d'immunité passive joue un rôle majeur dans la résistance du poulain aux agents infectieux et l'insuffisance de ce transfert est associée à une sensibilité accrue aux infections (Kohn *et al.* 1989). Le contrôle systématique de la qualité du colostrum et de la prise colostrale accompagné d'une détection et d'un traitement précoces des insuffisances de transfert d'immunité passive (Giguère et Prescott 1997, Prescott et Hoffman 1993) est donc préconisé (outre les méthodes habituelles de correction des transferts insuffisants d'immunité maternelle, l'administration de plasma hyperimmun peut être envisagée dans les élevages où la rhodococcose est enzootique).

- La prévention des maladies intercurrentes

Les affections intercurrentes comme les maladies respiratoires virales et les parasitoses peuvent entraîner une baisse de l'état général et de l'immunité.

Ainsi, bien que le rôle des principaux virus respiratoires [grippe, herpèsvirus équin de type 1-4 (ou HVE-1/HVE-4)] comme facteurs prédisposant à la maladie, ne soit pas prouvé (seulement suggéré pour HVE-2), (Belák *et al.* 1980, Nordengrahn *et al.* 1996), il est cependant utile de vacciner les juments et les poulains contre les maladies virales pour lesquelles des vaccins sont disponibles (Giguère et Prescott 1997) car, outre leur activité immuno-modulatrice, [principalement décrite pour les virus HVE, (Hannant *et al.* 1999)], ces virus respiratoires sont capables de générer des lésions inflammatoires pulmonaires.

De même, il convient de mettre en place des programmes de contrôle efficaces contre les parasites digestifs (Giguère et Prescott 1997), et notamment contre les ascaris (*Parascaris equorum*) en raison de leur migration pulmonaire au stade larvaire et du pouvoir spoliateur des vers adultes pouvant conduire à une atteinte sévère de l'état général. De plus, les infestations parasitaires par des helminthes pourraient induire chez les poulains une orientation de la réponse immune vers la voie Th2, qui n'est pas favorable à une protection vis-à-vis de la rhodococcose (Edmonds *et al.* 2001, Hamza *et al.* 2010).

## 2. Diagnostiquer précocement la maladie

Les bronchopneumonies à *R. equi* sont souvent diagnostiquées tardivement alors que les lésions sont déjà étendues et sont, dès lors, plus difficiles à traiter. En effet, les poulains, même à un stade avancé de la maladie, continuent de téter et présentent un comportement quasi-normal pour un observateur non averti.

Le diagnostic précoce de la maladie, associé à l'isolement et au traitement adapté des poulains malades, peut réduire la mortalité et la diffusion des bactéries virulentes dans l'environnement, et diminuer le coût du traitement (Giguère 2001).

Ainsi, toute procédure de dépistage systématique visant à une détection précoce des cas est recommandée dans les élevages où la rhodococcose est enzootique, bien qu'aucune étude contrôlée permettant d'étayer cette recommandation n'ait été conduite (Giguère *et al.* 2011).

Les modalités de diagnostic, ainsi que les méthodes à mettre en œuvre dans le cadre d'un protocole de dépistage systématique, sont détaillées dans le chapitre 3.4.

### **3.2.3.Recommandations**

Les conditions d'apparition et de développement de la rhodococcose du poulain, particulièrement complexes, sont loin d'être toutes élucidées. De nombreuses études ont déjà été réalisées pour déterminer les facteurs épidémiologiques permettant d'identifier les établissements à risque à l'instar des études réalisées en Basse-Normandie par Tapprest *et al.* en 2011 (Tapprest *et al.* 2011) ou celles conduites par les Haras nationaux depuis 2009 (Ferry et Baradeau 2010) pour tester sur le terrain un protocole de prévention spécifique et proposer des mesures de gestion sanitaire adaptées. Ces études se heurtent toutefois, indépendamment de l'insuffisance des connaissances relatives à l'écologie de *R. equi* et la physiopathologie de la maladie, à la variabilité des données acquises, dépendant notamment

des zones géographiques et des caractéristiques des élevages. Des études complémentaires seraient donc nécessaires pour mieux caractériser les différentes pratiques, recenser les mesures réellement appliquées dans les élevages et valider sur le terrain, dans les zones les plus touchées, les mesures de gestion sanitaire les mieux adaptées et les plus efficaces. En particulier, des études épidémiologiques pourraient être conduites pour mesurer de façon intégrée l'effet des pratiques de pâturage des mères suitées (par exemple, rotations, chargement, élimination des crottins et enherbement des paddocks ...) sur le risque de pneumonie chez les poulains. En effet, ces choix de gestion peuvent influencer la quantité d'agent pathogène auquel les poulains sont exposés, mais aussi influencer la réponse immunitaire contre les souches présentes dans leur environnement, dans la période critique de baisse de l'immunité colostrale.

### 3.3. Immunologie

En dépit de l'évolution des connaissances sur la réponse immunitaire chez les équidés, de nombreuses incertitudes subsistent sur les mécanismes qui permettent ou non aux poulains de réagir favorablement à une infection par des souches virulentes de *R. equi*. Après une revue succincte de ces mécanismes (paragraphe 3.3.1 ci-après), seront abordées les questions posées relatives à la réponse sérologique et à son intérêt pour le diagnostic (paragraphe 3.3.2), aux caractéristiques et à l'usage des plasmas hyperimmuns (PHI) pour la protection des poulains exposés à l'agent pathogène (paragraphe 3.3.3), au développement des vaccins et à leurs indications (paragraphe 3.3.4) et, enfin, aux autovaccins (paragraphe 3.3.5).

#### 3.3.1. Réponse immunitaire innée et adaptative vis-à-vis de *R. equi* chez le poulain : principes généraux

La majorité des équidés est en contact avec *R. equi*. L'infection d'un poulain au cours des 6 premiers mois (suivant la naissance) par une souche de *R. equi* pathogène (pVapA+) peut se traduire par une forme clinique de la maladie. Les animaux plus âgés sont généralement protégés. Toutefois, l'infection d'équidés adultes immunodéprimés est possible (Freestone *et al.* 1987). Les mécanismes immunitaires protecteurs ne sont pas encore totalement identifiés mais les réponses immunitaires innée, humorale et cellulaire, vont intervenir de manière significative à différentes phases du processus infectieux.

##### 3.3.1.1. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Cette réponse est rapide, non-spécifique, elle n'induit pas la mise en place d'une réponse mémoire mais va être essentielle pour le développement d'une réponse immunitaire adaptative protectrice (réponse spécifique dotée d'une mémoire).

Dans les voies respiratoires inférieures, les macrophages alvéolaires sont situés stratégiquement à l'interface entre le milieu extérieur et le tissu pulmonaire. Leur objectif principal est l'élimination de l'agent pathogène (phagocytose et autres activités microbicides), la stimulation de molécules pro-inflammatoires et chémotactiques ayant pour but le recrutement d'autres cellules immunitaires (tels que les polynucléaires neutrophiles) ainsi que l'initiation de la réponse immunitaire adaptative (incorporation et présentation des antigènes, orientation cytokinique, etc.).

L'opsonisation et la phagocytose de *R. equi* par les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles est une des premières étapes nécessaires pour son élimination. Plusieurs études suggèrent que ce mécanisme de défense pourrait être sous-optimal chez le jeune poulain et lié à une capacité d'opsonisation réduite (Gröndahl *et al.* 1999, Gröndahl, Johannisson, et Jensen-Waern 1997). L'activité bactéricide de ces cellules (poussée oxydative par exemple) pourrait également être réduite chez le jeune animal (Demmers *et al.* 2001), favorisant la survie intra-cellulaire de *R. equi*.

La reconnaissance de *R. equi* par les cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques) va impliquer la reconnaissance de motifs moléculaires (PAMPS : pathogen-associated molecular patterns) à la surface de l'agent pathogène par des récepteurs spécialisés à la surface des phagocytes (TLR : toll-like receptor par exemple). L'activation de ces récepteurs va entraîner l'activation de la cellule et la synthèse de cytokines et d'autres molécules immuno-modulatrices. Dans le cas de *R. equi*, cette reconnaissance va impliquer le TLR2 (TLR4 ne semble pas impliqué). La molécule VapA est capable d'activer par elle-même les cellules macrophagiques par l'intermédiaire du TLR2. Toutefois, cette activation peut avoir lieu en absence de VapA (Darrah *et al.* 2004). L'activation des cellules macrophagiques par *R. equi* va entraîner la synthèse de cytokines et molécules pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL6, IL12, IFN $\gamma$ , oxyde nitrique, etc.) (Darrah *et al.* 2004, Giguère et Prescott 1998). Certaines de ces cytokines, tels que l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$ , sont des activateurs des polynucléaires neutrophiles et augmentent leur activité oxydative. Le niveau de virulence des souches de *R. equi* peut influencer la nature et l'intensité de la réponse cytokinique observée (H Kasuga-Aoki *et al.* 1999). Bien que les cellules macrophagiques soient des cibles préférentielles de *R. equi*, des études utilisant le modèle murin ont démontré l'importance des cellules macrophagiques activées ainsi que des polynucléaires neutrophiles pour l'élimination de cet agent pathogène (Darrah *et al.* 2000, Martens *et al.* 2005). Le profil cytokinique (IFN $\gamma$  par exemple) induit par ces cellules au cours de la réponse immunitaire innée est également essentiel pour le développement d'une réponse immunitaire adaptative protectrice (Nerren *et al.* 2009).

Une étude récente semble suggérer une augmentation de la synthèse d'IFN $\gamma$  par les polynucléaires neutrophiles en réponse à une stimulation *ex vivo* par *R. equi* chez des poulains ayant reçu un immuno-modulateur (CpG-ODN+Emulsigen, administrations intramusculaires à l'âge de 1 et 7 jours). Ces résultats sont en faveur de l'implication des polynucléaires neutrophiles au cours de la réponse immunitaire innée mais également la possibilité d'augmenter cette réponse par l'utilisation de molécules immuno-modulatrices (Cohen *et al.* 2014). L'expression d'IFN $\gamma$  par les cellules mononucléées des bronches a également été mise en évidence *ex vivo* suite à la stimulation par VapA (Jacks *et al.* 2007).

Toutefois, *R. equi* est non seulement capable de résister à certains des mécanismes d'élimination mis en place au cours de la réponse innée, tels que le lysozyme (enzyme ayant une activité anti-microbienne) (Hébert *et al.* 2014), mais il va également cibler de manière spécifique les cellules immunitaires formant cette première ligne de défense. Les cibles cellulaires de *R. equi* sont principalement les cellules monocytaires (monocytes, macrophages, cellules dendritiques etc.) et tout particulièrement les macrophages alvéolaires avec lesquels *R. equi* va être rapidement en contact (Hondalus et Mosser 1994, Hondalus 1997). Ce mécanisme pathogénique regroupe 3 étapes, i) l'infection de la cible cellulaire, ii) la multiplication de *R. equi* au sein de la cellule infectée et iii) la destruction de la cellule infectée. Plusieurs mécanismes d'entrée/infection ont été décrits à ce jour, incluant la voie alterne du complément<sup>2</sup> (cette voie d'entrée n'est généralement pas associée à des niveaux élevés de dérivés réactifs de l'oxygène, ce qui pourrait améliorer la survie de *R. equi* au sein de la cellule infectée), une entrée par l'intermédiaire des récepteurs Fc<sup>3</sup>, une entrée par la reconnaissance de résidus  $\alpha$ -d-Manp (enveloppe cellulaire bactérienne) par les récepteurs du mannose (Garton *et al.* 2002, Hines 2014). La présence de pVapA altère la maturation de la cellule macrophagique infectée (blocage de la maturation du phagolysosome) se traduisant par une augmentation de la survie de *R. equi* au sein de la cellule (la réplication de souches de *R. equi* ne possédant pas le plasmide de virulence

---

<sup>2</sup> Fixation du complément sur *R. equi* et reconnaissance par les récepteurs CR3 exprimés à la surface des cellules macrophagiques

<sup>3</sup> Fixation des anticorps à la surface de *R. equi*, reconnaissance des anticorps fixés par les récepteur Fc et opsonisation

semble s'arrêter après environ 6 heures au sein de la cellule). VapA pourrait être impliquée dans le blocage de la maturation des phagolysosomes (prévention de l'acidification des vacuoles contenant *R. equi*), la modulation de la réponse cytokinique, l'expression de catalases augmentant la protection contre les métabolites oxydatifs, et l'augmentation de l'acquisition de fer par *R. equi* (Hondalus et Mosser 1994, von Bargen *et al.* 2009). La cellule infectée est détruite par nécrose (pic mesuré 24-48 h après infection) (Hondalus et Mosser 1994). Ce phénomène, qui n'est pas encore complètement élucidé, est fortement lié à la viabilité et à la virulence de la souche de *R. equi* ayant infecté la cellule macrophagique (Lührmann *et al.* 2004). Il est également possible que l'infection des macrophages et des cellules présentant l'antigène (CPA : cellules présentatrices de l'antigène) par *R. equi* réduise l'expression des molécules nécessaires à la présentation des antigènes bactériens (CD1b par exemple) ce qui va impacter la stimulation de la réponse immunitaire adaptative (Pargass *et al.* 2009).

### 3.3.1.2. Réponse immunitaire adaptative humorale

La réponse immunitaire humorale va principalement intervenir lors des phases précoces de l'infection, en ciblant directement *R. equi* afin de prévenir et/ou réduire l'infection cellulaire et les mécanismes d'évasion intracellulaire. L'infection du poulain par *R. equi* induit une réponse immunitaire humorale spécifique dirigée en particulier contre VapA et VapC. Des taux élevés d'anticorps anti-VapD et VapE ont également été mesurés chez les poulains souffrant de la forme clinique. Une corrélation inverse entre les taux d'anticorps et le score clinique pulmonaire après infection par *R. equi* semble exister (Hines, 2014). L'utilisation effective du transfert passif d'une immunité protectrice par ingestion de colostrum et/ou d'administration de plasma hyper-immun (HIP) est en faveur du rôle protecteur des anticorps contre *R. equi*. Dans la limite des connaissances actuelles, l'implication d'autres facteurs solubles (et/ou cellulaires dans le cas du colostrum) dans la protection contre l'infection par *R. equi* reste envisageable. La nature et l'activité protectrice de la réponse immunitaire humorale sont abordées plus en détails dans le chapitre 3.3.2.

### 3.3.1.3. Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Si la réponse humorale spécifique à *R. equi* présente au moment de l'infection n'est pas stérilisante, ne permettant pas une neutralisation complète du pathogène et entraînant l'infection de cellules macrophagiques, la réponse immunitaire à médiation cellulaire devient essentielle. En effet, au cours de la phase intra-cellulaire du processus infectieux, *R. equi* est relativement protégé de l'action des anticorps. La reconnaissance et l'élimination des macrophages infectés deviennent donc une priorité pour le système immunitaire.

Chez le cheval adulte, la réponse immunitaire à médiation cellulaire associée à l'élimination de *R. equi* implique l'activation et le recrutement au niveau pulmonaire de lymphocytes T CD4+ Th1 et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (Hines *et al.* 2001, Hines *et al.* 2003). Ces résultats confirment les données préalablement obtenues dans le modèle murin, les lymphocytes T CD8+ jouant un rôle prédominant (Kanaly, Hines, et Palmer 1993, Nordmann, Ronco, et Nauciel 1992). La résistance à l'infection par *R. equi* chez le cheval semble également associée au niveau d'expression de l'IFN $\gamma$ , qui est considéré comme étant un marqueur de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dans le cadre de l'infection par *R. equi* (Cauchard *et al.* 2013, Hines *et al.* 2003), mais également contre d'autres pathogènes équitins intracellulaires (Paillot *et al.* 2005, Paillot *et al.* 2007). L'importance de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  avait été préalablement suggérée dans le modèle murin. Le taux de survie de souris infectées avec une souche virulente de *R. equi* était significativement réduit en cas d'administration d'anticorps anti-IFN $\gamma$  ou anti-TNF $\alpha$ , 30 minutes avant l'infection expérimentale (H. Kasuga-Aoki *et al.* 1999). La stimulation de la réponse à médiation cellulaire suite à un contact avec *R. equi* semble importante chez le cheval adulte et beaucoup plus limitée chez le poulain.

L'état des connaissances immunologiques sur la réponse immunitaire chez le poulain nouveau-né est encore incomplet, les informations étant parfois contradictoires. Plusieurs études récentes indiquent que le poulain nouveau-né a la capacité d'établir une réponse Th1, impliquant la synthèse d'IFN $\gamma$  équivalente à celle observée chez le cheval adulte. La réponse Th2 semble toutefois réduite (Wagner, Burton, et Ainsworth 2010). D'autres études présentent des résultats et conclusions différents. Ainsi, la sécrétion d'IL-4 ou d'IFN $\gamma$  pourrait être réduite chez le jeune poulain (nouveau-né et âgé de 3 à 4 mois) après stimulation mitogénique par rapport à des poulains âgés de 6 mois ou des chevaux adultes (Ryan *et al.* 2010, Breathnach *et al.* 2006). Une augmentation des taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> régulateurs (Treg), qui possèdent une activité immunologique suppressive, a été mesurée chez des poulains âgés de 3 à 4 mois par rapport à des yearlings et des juments adultes (Hamza *et al.* 2011, Hamza *et al.* 2015). Dans cet environnement, une altération de la stimulation des réponses Th1 et/ou Th2 par ces mécanismes régulateurs est possible.

Les mécanismes protecteurs chez le poulain ne sont pas encore complètement identifiés mais la stimulation d'une réponse cytotoxique T CD8<sup>+</sup> capable de lyser des cellules infectées par *R. equi* a été démontrée chez le poulain nouveau-né après inoculation orale d'une souche *R. equi* vivante (3 inoculations au cours des 2 premières semaines après la naissance) (Harris *et al.* 2011). La nature des antigènes reconnus reste à être définir. Toutefois, la reconnaissance d'antigènes lipidiques présents dans la paroi bactérienne et unique à *R. equi* (présentation par les molécules CD1 et non pas par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité) a été démontrée et pourrait être un composant important de la réponse protectrice contre *R. equi* (K. M. Patton *et al.* 2005, Harris *et al.* 2010, Patton *et al.* 2004). Toutefois, le taux d'expression des molécules CD1 à la surface des cellules CPA semble être réduit chez le jeune poulain (ainsi que les molécules du CMH de type II) et pourrait être inhibé au cours de l'infection par *R. equi* (Pargass *et al.* 2009). Dans un modèle *in vitro* de cytotoxicité à médiation cellulaire, le taux de lyse de cellules équine infectées par *R. equi* ne semble pas être modifié par la présence ou l'absence du plasmide de virulence. Ce résultat indique que le ou les antigènes cibles de la réponse immunitaire cytotoxique ne sont pas encodés par le plasmide de virulence et restent à identifier (Patton *et al.* 2004). Les taux d'IFN $\gamma$  produit après stimulation antigénique étaient également équivalents à ceux mesurés chez le cheval adulte (Harris *et al.* 2011). La synthèse d'IFN $\gamma$  (ainsi que d'autres cytokines telles que l'IL12 et l'IL10) par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pulmonaires a été démontrée chez le poulain après infection par une souche virulente de *R. equi* (Giguere, Wilkie, et Prescott 1999). Cette étude suggère également une activité immuno-modulatrice de VapA, avec une expression limitée des ARNm de l'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pulmonaires, suite à l'infection intra-bronchéolaire par une souche *R. equi* VapA- (en comparaison avec la souche parentale virulente).

En conclusion, la réponse humorale (anticorps) reconnaît et cible directement *R. equi* afin de le neutraliser dans les premiers moments de l'infection. Si cette réponse n'est pas suffisante, *R. equi* va infecter les macrophages alvéolaires et ainsi échapper à la réponse humorale. Dans ce contexte, la réponse à médiation cellulaire devient essentielle pour identifier et détruire les macrophages alvéolaires et autres cellules infectées par *R. equi*, afin de contenir sa réplication et éliminer l'infection. L'IFN $\gamma$  est une cytokine majeure dans la stimulation, l'orientation et l'établissement de cette réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th1 (l'IFN $\gamma$  est souvent utilisé comme marqueur pour mettre en évidence cette réponse cellulaire). L'engagement au niveau pulmonaire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1 et les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> va jouer un rôle prédominant dans ce processus d'identification et d'élimination des cellules infectées.

### 3.3.2. Réponse sérologique chez les équidés infectés

Au cours des trente dernières années, de nombreux tests sérologiques visant à détecter des anticorps anti-*R. equi* ont été développés, principalement à des fins de recherche. Les objectifs de ces tests étaient de rechercher l'existence d'une éventuelle réponse immune humorale lors de l'infection par *R. equi* et de la caractériser chez les poulains.

Par la suite, l'intérêt de ces méthodes dans le diagnostic de la maladie ou dans la détection précoce des poulains infectés dans les élevages atteints de façon enzootique a été exploré.

#### 3.3.2.1. Etat des connaissances

##### 1. Les méthodes et les antigènes utilisés

Plusieurs méthodes sérologiques visant à détecter des anticorps dirigés contre des antigènes totaux ou spécifiques de *Rhodococcus equi* ont été développées et sont décrites dans la littérature. Outre les modalités de mise en évidence des anticorps, elles diffèrent par de nombreux paramètres tels que les antigènes, les sérums témoins négatif et positif et les gammes de dilution utilisés. Elles n'ont fait l'objet d'aucune tentative de standardisation, de sorte que, même pour une technique donnée, les résultats obtenus par divers auteurs ne peuvent pas être comparés et restent d'interprétation délicate.

##### ✓ Tests sérologiques recherchant des anticorps anti-equi factors

Les "equi factors" regroupent des exoenzymes de *R. equi* incluant la cholestérol oxydase et la phospholipase C. Ces equi factors produisent une lyse des globules rouges sensibilisés préalablement, soit par la toxine  $\beta$  de *Staphylococcus aureus*, soit par la toxine C de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, d'où l'emploi du terme d'hémolyse synergique pour désigner ce phénomène.

Les "equi factors", présents dans le surnageant des cultures bactériennes, étaient collectés par divers procédés, en mélange avec d'autres antigènes solubles (Becu, Polledo, et Gaskin 1997, Nakazawa *et al.* 1987, Prescott, Coshan-Gauthier, et Barksdale 1984, Skalka et Švastová 1985).

Plusieurs méthodes sérologiques comme l'immunodiffusion en gélose et le test de fixation du complément reposaient sur l'utilisation de mélanges d'antigènes contenant des "equi factors" (Becu, Polledo, et Gaskin 1997, Nakazawa *et al.* 1987) mais plus spécifiquement le test d'inhibition ou de neutralisation de l'hémolyse synergique (Prescott, Coshan-Gauthier, et Barksdale 1984, Skalka et Švastová 1985).

##### ✓ Tests sérologiques recherchant des anticorps dirigés contre des antigènes totaux

Des mélanges d'antigènes totaux de *R. equi* sont obtenus grâce à des procédés entraînant une destruction des bactéries; ils contiennent, outre des exoenzymes, des composants de la paroi, des polysaccharides capsulaires, des protéines Vap et des antigènes somatiques (Giguère, Hernandez, Gaskin, Prescott, *et al.* 2003). Les corps bactériens, issus de souches virulentes (Prescott *et al.* 1996, Prescott *et al.* 1997) ou d'un mélange de souches (Takai, Kawazu, et Tsubaki 1985), sont cassés par diverses techniques comme la sonication, l'autoclavage ou l'ébullition (Takai, Kawazu, et Tsubaki 1985, Tirosh-Levy *et al.* 2017, Witkowski *et al.* 2012), des cycles de congélation/décongélation (Jacks *et al.* 2007) ou à l'aide de détergents, principalement le Tween 20 et le Triton X114 (Cauchard *et al.* 2004, Hooper-McGrevy *et al.* 2001, Prescott *et al.* 1996, Prescott *et al.* 1997), avant que la suspension bactérienne traitée ne soit centrifugée.

Les méthodes qui utilisent ces mélanges d'antigènes totaux sont principalement des tests ELISA.

Certains de ces tests ELISA visent à détecter des anticorps dirigés principalement contre la protéine VapA. La richesse en VapA des préparations antigéniques est alors vérifiée par western blot sur SDS PAGE (Cauchard *et al.* 2004, Prescott *et al.* 1996, Witkowski *et al.* 2012).

- ✓ Tests sérologiques recherchant des anticorps anti-VapA ou dirigés contre des épitopes immunogènes de VapA

D'autres travaux se sont intéressés plus spécifiquement à l'antigène VapA avec notamment la production de protéines VapA recombinantes (Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2003, Lopez *et al.* 2002), des peptides synthétiques des protéines Vap (Cauchard *et al.* 2006) et des peptides synthétiques correspondant à des épitopes immunogènes N-terminal et C-terminal de VapA (Phumoonna *et al.* 2006, Taouji *et al.* 2002). Des méthodes ELISA ont été utilisées pour rechercher les anticorps dirigés contre ces protéines et peptides.

## 2. Etude de la réponse immune humorale

- ✓ Démonstration d'une réponse immune humorale et cinétique des anticorps

Plusieurs études réalisées dans des populations de chevaux sains incluant des chevaux adultes ont montré, par diverses méthodes sérologiques, l'existence d'une réponse immune humorale dirigée contre *R. equi* (Attili *et al.* 2006, Hietala, Ardans, et Sansome 1985, Takai, Kawazu, et Tsubaki 1986, Tirosh-Levy *et al.* 2017, Witkowski *et al.* 2012). Ces résultats soulignent la fréquence et l'intensité de l'exposition à la bactérie chez les chevaux d'élevage, y compris dans les élevages indemnes de cas cliniques (Witkowski *et al.* 2012).

Chez les chevaux adultes sains naturellement exposés à des bactéries virulentes, les différentes classes d'immunoglobulines sont détectées : IgG, IgM et IgA (Takai, Kawazu, et Tsubaki 1986).

Les variations de titres mesurées chez les chevaux adultes (≥4 ans) seraient faibles (Takai, Kawazu, et Tsubaki 1986).

Chez le poulain, les anticorps anti-*R. equi* sont absents à la naissance (Hietala, Ardans, et Sansome 1985, Takai, Kawazu, et Tsubaki 1986). Les anticorps spécifiques d'origine colostrale sont mis en évidence dans la première semaine de vie (Hietala, Ardans, et Sansome 1985) puis montrent une décroissance à une période qui varie selon les auteurs et les méthodes sérologiques utilisées : autour de 20-30 jours (Jacks *et al.* 2007, Takai *et al.* 1995) jusqu'à 2 mois (Hietala, Ardans, et Sansome 1985). Chez des poulains tout-venant, les taux d'anticorps spécifiques anti-*R. equi* atteindraient le niveau observé chez les chevaux adultes autour de 5-6 mois d'âge selon (Hietala, Ardans, et Sansome 1985) et seraient maximaux à 2 ans selon (Takai, Kawazu, et Tsubaki 1986).

Cependant, en présence d'une exposition naturelle intense (poulains provenant d'élevages où la maladie est enzootique ou hébergeant des concentrations élevées de bactéries dans le contenu intestinal), les titres en anticorps anti-*R. equi* augmenteraient dès l'âge de 4 à 8 semaines (Takai *et al.* 1995) pour atteindre les niveaux d'IgM et d'IgG anti-*R. equi* mesurés chez les chevaux adultes aux environs de 5-9 semaines d'âge et une valeur maximale à 2-3 mois (Takai *et al.* 1995). Par la suite, ces concentrations diminueraient pour rejoindre les niveaux enregistrés chez les chevaux adultes entre 3 et 6 mois d'âge (Takai *et al.* 1995).

- ✓ Caractérisation de la réponse immune humorale

- Classes d'immunoglobulines et sous-classes d'IgG

Les classes d'immunoglobulines et les sous-classes d'IgG impliquées dans la réponse immune humorale dirigée contre *R. equi* ont été étudiées dans le cadre d'infections naturelles ou expérimentales aussi bien chez les poulains que chez les chevaux adultes.

- *Chevaux adultes*

La réponse immune humorale chez des chevaux adultes inoculés par voie intrabronchique avec des bactéries virulentes a été étudiée par (Lopez *et al.* 2002) et

(Jacks *et al.* 2007) à l'aide de méthodes ELISA recherchant des anticorps dirigés, soit contre une préparation antigénique obtenue à partir des bactéries entières et composée d'un mélange d'antigènes extracellulaires et somatiques (Jacks *et al.* 2007, Lopez *et al.* 2002), soit contre la protéine VapA (Lopez *et al.* 2002).

Les résultats de Lopez *et al.* (2002) montrent que les IgG anti-*R. equi* et anti-VapA ont augmenté significativement 14 jours après l'inoculation. En ce qui concerne les immunoglobulines anti-VapA, toutes les classes et sous-classes analysées, à savoir les IgGa, IgGb, IgG(T), les IgM et les IgA, ont vu leur concentration augmenter. La réponse en anticorps anti-*R. equi* était identique, à l'exception des IgA qui n'ont pas montré d'accroissement de titre. La réponse humorale, que ce soit pour les anticorps anti-*R. equi* ou pour les anticorps anti-VapA, était caractérisée 14 jours après inoculation par une prédominance des IgGb et des IgGa.

Dans l'étude de (Jacks *et al.* 2007), seules les IgGb présentaient une augmentation significative 15 jours après l'inoculation intrabronchique.

- *Poulains*

(Takai, Kawazu, et Tsubaki 1987) ont étudié à l'aide d'une méthode ELISA (Takai, Kawazu, et Tsubaki 1985, Takai, Kawazu, et Tsubaki 1986) la réponse immune humorale en IgG, IgM et IgA dirigée contre des antigènes totaux de *R. equi* chez 3 poulains infectés expérimentalement par *R. equi*, selon des voies et avec des souches différentes, et chez un poulain infecté naturellement et ayant développé une pneumonie.

Suite à l'inoculation intratrachéale d'une dose élevée de bactéries virulentes, des signes cliniques ont été constatés dès le deuxième jour après l'infection ; une forte augmentation des IgG a été mesurée 6 jours après inoculation, suivie par un accroissement progressif des IgM et des IgA sur toute la durée de l'étude (16 jours). Après inoculation d'une souche avirulente, seule une augmentation des IgG a été observée dans les 6-12 jours après inoculation.

Le poulain infecté naturellement a présenté des signes cliniques à 5 semaines d'âge. Des IgG anti-*R. equi* ont été détectées une semaine plus tard et ont montré une augmentation de concentration très marquée jusqu'à la mort du poulain. En revanche, aucune évolution n'a été constatée pour les IgM et les IgA.

L'administration quotidienne *per os* de *R. equi* virulents à un poulain pendant 9 semaines a entraîné un accroissement marqué des IgG anti-*R. equi* 2 semaines après la première administration. Le taux d'IgG s'est maintenu à un niveau élevé pendant 3 semaines puis a décru progressivement. Les deux autres classes, IgM et IgA, ont augmenté légèrement, respectivement à 5 semaines et 2 semaines après l'inoculation initiale. Un résultat concordant a été obtenu par (Takai, Kawazu, et Tsubaki 1986) pour les IgM avec un accroissement 5-8 semaines après l'inoculation initiale.

Les auteurs concluent que la réponse immune humorale du poulain dirigée contre *R. equi* peut être affectée par la souche, la voie et l'intensité de l'exposition.

Les différentes sous-classes d'IgG impliquées dans la réponse humorale des poulains ont été étudiées par (Jacks et Giguère 2010) et (Sanz *et al.* 2015) en utilisant une méthode ELISA dont les antigènes étaient respectivement une préparation composée d'antigènes solubles extracellulaires et somatiques, et la protéine VapA recombinante.

Chez des poulains infectés expérimentalement par voie intrabronchique avec une dose faible ou une dose élevée d'un inoculum virulent, les premiers auteurs ont constaté que le ratio moyen des concentrations d'IgG(T) anti-*R. equi* après et avant infection était significativement plus élevé chez les poulains ayant reçu une dose forte d'inoculum par rapport à ceux ayant reçu une dose faible. Il en était de même pour le ratio moyen des concentrations d'IgM après et avant infection. L'administration d'une

dose infectante élevée s'était traduite par une augmentation de 62 à 328 fois de la concentration en IgG(T) pré-infection.

En revanche, l'infection des poulains avec une dose faible (méthode reconnue pour produire une évolution progressive de la maladie proche de l'infection naturelle) était associée à une augmentation significative des IgGa, IgGb, IgGc et IgM anti-*R. equi* mais pas des IgG(T).

L'étude de (Sanz *et al.* 2015) a concerné des poulains naturellement infectés ou infectés expérimentalement par voie intrabronchique.

L'ensemble des poulains a présenté une diminution des IgG et des sous-classes d'IgG anti-VapA au cours des 2 à 4 premières semaines de vie, liée au déclin naturel des anticorps colostraux.

L'infection expérimentale par voie trachéale avec une dose faible de bactéries virulentes a entraîné, comme dans l'étude citée précédemment, une augmentation significative des IgGa, mais également des IgG(T) entre 4 et 6 semaines après l'infection, l'augmentation étant plus précoce pour les IgG(T). Après infection naturelle diagnostiquée par la présence de lésions pulmonaires à l'échographie aux environs de 3 semaines, seules les IgG(T) spécifiques anti-VapA ont augmenté au cours du temps et à partir de 5 semaines.

Cette divergence de résultats concernant l'évolution des IgG(T) chez les poulains infectés expérimentalement par voie intrabronchique à l'aide de dose faible de bactéries virulentes pourrait découler des différences entre les méthodes ELISA utilisées, et notamment des différences d'antigènes.

Les résultats obtenus lors d'infection naturelle accompagnée de lésions pulmonaires semblent être confirmés par l'étude (Sanz *et al.* 2016) qui tend à montrer que les IgG(T), contrairement aux autres sous-classes d'IgG, seraient un bon indicateur de la maladie.

- Réponse humorale dirigée contre les différentes protéines Vap

La réponse humorale en anticorps anti-protéines Vap (Vap A,C, D, E, F, G et H) a été étudiée chez des chevaux adultes, des poulains naturellement exposés à la bactérie mais sains et enfin, des poulains atteints de pneumonie à *R. equi* (Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2003). Suite à une exposition naturelle à des *R. equi* virulents, seuls les anticorps anti-VapA et anti-VapC augmentent. En revanche, les anticorps anti-VapF, VapG et VapH ne montrent aucune évolution et les anticorps anti-VapE ne sont pas détectés.

Les anticorps anti-VapD croissent légèrement chez certains poulains quelques semaines après le pic de réponse à VapA et VapC. La réponse marquée en anticorps anti-VapA et VapC était identique dans les 3 groupes d'animaux. Les poulains atteints de pneumonie présentaient des concentrations en anticorps anti-VapD et VapE plus élevées que les poulains cliniquement indemnes.

Les différentes sous-classes d'IgG (IgGa, IgGb, IgGc et IgG(T)) dirigées contre chaque protéine Vap ont été recherchées. De manière générale, l'isotype IgGc était quasiment absent. La réponse en IgG(T) anti-VapA, VapC et VapG des poulains malades était significativement plus élevée que celle des chevaux adultes. Les adultes ont présenté une réponse dominée par des IgGa contre VapA, VapC, VapF et VapH relativement aux IgGb et IgG(T). Bien que les poulains atteints de pneumonie aient produit des IgGa contre VapA et VapC, chez ces animaux, les IgGb étaient prédominantes et vis-à-vis de toutes les protéines Vap. Les concentrations en IgGb des poulains malades étaient significativement plus élevées que celles des chevaux adultes pour VapA, VapC, VapD, VapE et VapG et significativement plus élevées que celles des poulains sains pour VapC, VapE et VapG.

### 3.3.2.2. Intérêt diagnostique des tests sérologiques

Diverses études ont évalué l'intérêt diagnostique des méthodes sérologiques recherchant des anticorps anti-*R. equi* ou dirigés contre divers antigènes de *R. equi*.

En ce qui concerne les méthodes ciblant principalement les anticorps anti-equin factors, les résultats obtenus tendent à montrer que l'augmentation des anticorps se manifeste uniquement chez les poulains malades ou cliniquement suspects (Prescott, Coshan-Gauthier, et Barksdale 1984) et ne caractériseraient que les stades tardifs de l'infection (Prescott et Hoffman 1993).

Cependant, (Prescott *et al.* 1989) constatent, par la technique de l'inhibition de l'hémolyse synergique (Skalka et Švastová 1985), que certains poulains présentant des signes cliniques ne séroconvertissent pas, ce qui traduirait un manque de sensibilité de ce test.

L'étude de (Hietala, Ardans, et Sansome 1985) sur l'immunodiffusion en gélose conclut, en raison de l'hétérogénéité des réponses observées d'un animal à l'autre, qu'elle ne permet pas de détecter tous les poulains infectés. Deux autres études (Giguère, Hernandez, Gaskin, Prescott, *et al.* 2003, Sellon *et al.* 2001) portant également sur l'immunodiffusion en gélose, établissent une sensibilité et une spécificité de respectivement 62,5% - 75,9% et 62,5% - 53,8%. (Giguère, Hernandez, Gaskin, Prescott, *et al.* 2003) concluent que ce test sérologique ne présente qu'un faible intérêt dans la détection précoce des cas d'infection par *R. equi*.

Par ailleurs, cette méthode se révèle moins performante pour le diagnostic de l'infection que la technique PCR mettant en évidence le plasmide de virulence dans un prélèvement trachéal ou la numération-formule des leucocytes sanguins (Giguère, Hernandez, Gaskin, Prescott, *et al.* 2003, Sellon *et al.* 2001).

Dès 1985, (Takai, Kawazu, et Tsubaki 1985) avaient montré, à l'aide d'un antigène obtenu par extraction au Tween 20, que l'ELISA était une méthode plus sensible que l'immunodiffusion en gélose.

Par la suite, deux études ont comparé la sensibilité et la spécificité de différents ELISA et d'autres méthodes sérologiques comme l'immunodiffusion en gélose et l'inhibition de l'hémolyse synergique (Giguère, Hernandez, Gaskin, Prescott, *et al.* 2003, Martens, Cohen, Chaffin, Takai, *et al.* 2002).

(Martens, Cohen, Chaffin, Takai, *et al.* 2002) concluent qu'aucune des méthodes testées dont 3 ELISA, ne permet de distinguer de manière fiable les poulains atteints de rhodococcose des poulains indemnes et donc qu'aucune ne permet l'établissement, la confirmation ou l'infirmerie d'un diagnostic de pneumonie à *Rhodococcus equi*.

L'étude de (Giguère, Hernandez, Gaskin, Prescott, *et al.* 2003) a comparé l'intérêt de 4 tests ELISA différents et d'une méthode d'immunodiffusion en gélose dans le diagnostic des cas de pneumonie à *R. equi*. Les résultats montrent que l'immunodiffusion en gélose est moins sensible que chacun des 4 ELISA. Pour chaque test, le choix d'un seuil de positivité bas s'accompagne d'une sensibilité élevée et d'une spécificité faible. L'élévation du seuil entraîne une augmentation de spécificité mais une réduction de la sensibilité. L'ELISA utilisant un mélange d'antigènes solubles montre la meilleure performance diagnostique avec une sensibilité de 59% et une spécificité de 88%. Cependant, les auteurs concluent qu'aucune méthode sérologique étudiée ne permet de distinguer les poulains malades des poulains sains et donc aucune ne présente d'intérêt diagnostique.

Plusieurs études ont évalué les performances diagnostiques d'ELISA utilisant comme antigènes des peptides, épitopes immunogènes, de la protéine VapA.

(Vanniasinkam, Barton, et Heuzenroeder 2001) ont développé un ELISA recherchant des anticorps dirigés contre un épitope linéaire de VapA (NLQKDEPNGRA). Ils observent une amélioration de la sensibilité de cette méthode relativement à un ELISA ciblant des anticorps anti-*R. equi*.

L'étude de (Taouji *et al.* 2002) a testé également un ELISA dont l'antigène était un peptide N-terminal de VapA (NLQKDEPGRASDT), de séquence très proche de celle du peptide précédent. Les résultats montrent que cette méthode est plus sensible qu'un ELISA ciblant des anticorps anti-VapA recombinante et permet un diagnostic sérologique précoce des cas d'infection par *R. equi*.

(Phumoonna *et al.* 2006) ont évalué la sensibilité, la spécificité et la capacité à identifier les cas de pneumonie à *R. equi* d'un ELISA utilisant comme antigène un peptide immunogène N-terminal de VapA (TSLNLQKDEPNGRASDTAGQ) dont la séquence intègre celles des peptides étudiés par (Taouji *et al.* 2002) et (Vanniasinkam, Barton, et Heuzenroeder 2001). La mise en évidence des IgG totales par cette méthode conduit à une sensibilité de 47,62%, une spécificité de 69,67% et une valeur prédictive des cas de maladie de 57,47%. Les performances de cet ELISA ont été améliorées par la détection d'IgGb dirigés contre le même antigène : la sensibilité s'est alors élevée à 70,47%, la spécificité à 72,13% et la valeur prédictive à 68,52%. Les auteurs concluent que la détection d'IgGb dirigés contre l'épitope en question est un meilleur outil de détection des cas de rhodococcose chez les poulains que les ELISA recherchant les IgG totales. Par ailleurs, même si les performances diagnostiques de cet ELISA détectant des IgGb n'atteignent pas les valeurs de sensibilité/spécificité optimales de 90-95%, les auteurs soulignent que cette méthode obtient des résultats comparables à ceux d'autres méthodes non sérologiques, d'intérêt diagnostique reconnu et utilisées en routine, comme la radiographie et l'échographie thoracique, ou la mise en évidence par PCR de bactéries virulentes dans des prélèvements trachéaux.

Seule l'étude la plus récente montre l'intérêt d'un test ELISA détectant les IgG(T) contre la protéine VapA, avec 90% de sensibilité et 96% de spécificité (Sanz *et al.* 2016).

Cependant, malgré ces pistes d'amélioration concernant la technique ELISA et portant sur l'utilisation de peptides de VapA immunogènes, la conférence de consensus tenue par l'ACVIM en 2011 (Giguère *et al.* 2011) conclut que l'état actuel des connaissances ne permet pas de recommander les tests sérologiques dans le diagnostic des pneumonies à *R. equi*.

### 3.3.2.3. Conclusions et recommandations

Les méthodes sérologiques recherchant des anticorps anti-*R. equi* ou dirigés contre divers antigènes de *R. equi* (dont la protéine VapA) permettent de mettre en évidence des anticorps qui peuvent être d'origine colostrale ou indiquer une exposition à la bactérie, une infection subclinique ou un cas de rhodococcose. De manière générale, les techniques ELISA semblent actuellement plus efficaces dans la détection des anticorps anti-*R. equi* que les autres méthodes.

Ces constats soulignent l'intérêt de ces techniques pour la conduite d'enquêtes de prévalence sérologiques (Attili *et al.* 2006, Tirosh-Levy *et al.* 2017, Cuteri *et al.* 2003) et pour évaluer la qualité d'un plasma hyperimmun. En revanche, elles ne peuvent être recommandées pour le diagnostic des pneumonies à *R. equi*.

## 3.3.3. Intérêt du plasma hyperimmun dans la prévention médicale de la rhodococcose

### 3.3.3.1. Etat des connaissances

En l'absence de vaccin commercial disponible, la prophylaxie médicale de la rhodococcose dans les élevages où la maladie sévit de façon enzootique repose encore actuellement sur l'administration aux poulains d'un plasma hyperimmun (PHI) spécifique de souches virulentes de *R. equi* (Muscatello 2012).

Le transfert passif d'immunité joue un rôle majeur dans la résistance du poulain aux agents infectieux et l'insuffisance de ce transfert est associée à une sensibilité accrue aux infections (Kohn *et al.* 1989). Par ailleurs, la diminution des anticorps maternels se produit chez les poulains à l'âge où les cas de pneumonie dus à *R. equi* sont habituellement diagnostiqués (Demmers *et al.* 2001, Prescott 1991) ce qui suggère un rôle protecteur des anticorps contre

l'infection par *R. equi* (Dawson *et al.* 2010). C'est sur ce constat que sont fondés les protocoles de prévention de la rhodococcose chez les poulains par l'administration de PHI (Madigan, Hietala, et Muller 1991).

L'objectif de l'administration de PHI est de fournir au poulain, durant sa période de sensibilité à l'infection, une large gamme d'anticorps dirigés contre des *R. equi* virulents ainsi que d'autres facteurs, afin de renforcer les mécanismes effecteurs de l'immunité humorale dirigée contre cette bactérie (Dawson *et al.* 2010, Muscatello 2012).

### 1. Bases théoriques de l'efficacité du PHI

Même si les composants responsables de la protection conférée par le PHI sont encore mal connus, les anticorps dirigés contre les protéines VapA et VapC semblent jouer un rôle crucial et d'autres facteurs non spécifiques comme des cytokines, des facteurs du complément, la fibronectine, des collectines et des protéines de la phase aiguë de l'inflammation pourraient également y contribuer (Giguere 2001, Muscatello 2012).

#### ✓ Rôle des anticorps spécifiques

Un ensemble de résultats suggère que les anticorps pourraient être des composants majeurs du PHI (Giguère *et al.* 2002).

Les anticorps spécifiques peuvent neutraliser directement les agents pathogènes avant qu'ils ne rejoignent l'espace intracellulaire. Ainsi, suite à l'administration de PHI, les anticorps spécifiques anti-*R. equi* qui diffusent dans les voies respiratoires du poulain, améliorent la clairance pulmonaire de la bactérie (Flaminio 2010, Prescott *et al.* 1997). Le PHI serait donc efficace lorsque son administration précède l'exposition, ce qui est confirmé par plusieurs auteurs (Chaffin *et al.* 1991, Muller et Madigan 1992).

Les anticorps spécifiques ont également un rôle essentiel en tant qu'opsonines pour une phagocytose efficace (Demmers *et al.* 2001, Flaminio 2010). L'opsonisation de *R. equi* par des anticorps spécifiques favorise *in vitro* la phagocytose et la destruction des bactéries par les macrophages alvéolaires du poulain (Hietala, Ardans, et Sansome 1985, Zink *et al.* 1985). Une augmentation du relargage oxydatif des polynucléaires neutrophiles et des macrophages et de la libération de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  par les macrophages est également observée en présence de bactéries opsonisées (Dawson *et al.* 2009).

#### • Rôle des anticorps dirigés contre les protéines Vap

Tous les antigènes de *R. equi*, utilisés dans le cadre des diverses méthodes sérologiques, n'induisent pas la production d'anticorps protecteurs. C'est le cas, par exemple, des exoenzymes de *R. equi* (cholestérol oxydase et phospholipase C) (Machang'u et Prescott 1991).

En revanche, les démonstrations du rôle protecteur des anticorps anti-VapA sont nombreuses tant *in vitro* (Tan *et al.* 1995) que dans le modèle murin (Fernandez, Prescott, et Nicholson 1997) ou l'espèce cible :

- L'administration aux poulains d'un plasma provenant d'un cheval immunisé avec des protéines VapA partiellement purifiées et riche en IgG spécifiques, renforce la clairance pulmonaire de la bactérie, par comparaison avec des poulains ne recevant pas de plasma ou bien un plasma dépourvu d'anticorps spécifiques anti-VapA (Prescott *et al.* 1997).
- L'administration intraveineuse à des poulains d'immunoglobulines purifiées obtenues chez des chevaux immunisés avec des protéines VapA et VapC recombinantes, a réduit la sévérité de la pneumonie après une infection expérimentale sévère par *R. equi*. Dans cette même étude, le degré de protection conféré par les immunoglobulines anti-VapA et anti-VapC était

identique à celui apporté par un PHI ayant un titre élevé en anticorps anti-VapA (Hooper-McGrevy et al. 2001).

Ainsi, selon les résultats obtenus dans l'espèce cible, les immunoglobulines dirigées contre VapA et VapC seraient responsables de la protection conférée par le PHI.

- Rôle des sous-classes d'IgG

Diverses études ont cherché à définir le profil isotypique des immunoglobulines dirigées contre les protéines Vap qui est associé à la protection contre la rhodococcose chez les chevaux adultes et les poulains naturellement immuns.

Les résultats des premières études, obtenus lors d'infections naturelles ou expérimentales, semblaient démontrer qu'une production accrue d'IgGa et d'IgGb, accompagnée d'une prédominance des IgGa, était protectrice (Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2003, Lopez *et al.* 2002, Takai *et al.* 2002).

Par ailleurs, les PHI commerciaux contiennent principalement des IgGb, des IgGa mais en moindre concentration, et une très faible quantité d'IgG(T) (Sanz *et al.* 2014), ce qui est plutôt en faveur d'une production principale d'IgGa et d'IgGb, dominée par les IgGb, chez les chevaux adultes immunisés.

Cependant, deux études (Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2005, Jacks, Giguère, et Prescott 2007) sont venues remettre en question ces résultats, aussi bien chez les adultes que chez les poulains.

Les résultats de Jacks *et al.* en 2007 (Jacks, Giguère, et Prescott 2007) tendent à infirmer le rôle protecteur des IgGa chez les chevaux adultes et du couple IgGa et IgGb chez les poulains, infectés expérimentalement dans les deux cas.

Les travaux de Hooper-McGrevy *et al.* en 2005 (Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2005) montrent que des poulains immunisés par voie orale sont protégés vis-à-vis d'une infection expérimentale réalisée 3 semaines plus tard et présentent une production dominante d'IgG(T) relativement aux IgGa et IgGb. La production d'IgG(T) étant considérée comme associée à une réponse immune de type Th2, ce résultat viendrait contredire le caractère protecteur admis d'une réponse immune de type Th1. Les auteurs concluent prudemment que le profil isotypique des immunoglobulines G ne permet pas d'évaluer le niveau de protection contre la maladie.

En conclusion, il semblerait que, chez les poulains immuns et les poulains malades, le profil isotypique puisse varier grandement en fonction de certains facteurs comme la voie d'exposition à la bactérie, la dose infectieuse et la nature de l'infection, expérimentale ou naturelle. Ainsi, les données de la littérature ne permettent pas de statuer avec certitude sur la composition isotypique des IgG à rechercher pour les PHI afin de garantir une protection des poulains contre la rhodococcose pulmonaire.

✓ Rôle potentiel de facteurs plasmatiques autres que les anticorps

Un certain nombre d'observations suggère que des facteurs autres que les anticorps pourraient également contribuer à la protection conférée par le PHI.

Ainsi, des taux élevés d'anticorps anti-*R. equi* transmis aux poulains, via le colostrum, par la mère immunisée, ne protègent pas les poulains de la maladie (Martens, Martens, et Fiske 1991) ou ne confèrent pas une protection équivalente à celle d'un PHI produit sur des donneurs immunisés avec une préparation antigénique identique à celle administrée aux juments (Prescott *et al.* 1997).

Par ailleurs, chez les poulains, le niveau de résistance à l'infection ne semble pas corrélé à la concentration sanguine en anticorps spécifiques (Martens *et al.* 1989).

Enfin, aucune différence relative à la mortalité ou à la sévérité de la maladie n'a été observée entre deux lots de poulains infectés expérimentalement à 21 jours et ayant reçu soit du plasma normal, soit du PHI (Perkins *et al.* 2002).

Cet ensemble de résultats permet de suspecter l'intervention de facteurs non spécifiques présents dans le plasma normal et le PHI mais pas dans le colostrum, comme la fibronectine, le complément et les cytokines (Dawson *et al.* 2010). La nature et le rôle exacts de ces facteurs demeurent indéterminés.

## 2. Analyse des essais *in vivo* explorant l'efficacité du PHI

De nombreuses études ont été réalisées depuis les années 80 pour évaluer la capacité des PHI à prévenir ou à traiter la rhodococcose pulmonaire du poulain.

### ✓ Bilan des études *in vivo* disponibles

Quatorze publications présentant les résultats de telles études ont été recensées dont douze dans des revues scientifiques à comité de lecture, une dans les actes d'un colloque avec comité de lecture et une dernière disponible sur Internet n'ayant pas fait l'objet d'une relecture scientifique. Douze ont recherché un effet préventif vis-à-vis de la maladie et une seule, un effet thérapeutique (Tableau 1).

Parmi les douze publications parues dans des revues scientifiques à comité de lecture, cinq ont étudié l'effet de PHI commerciaux dont quatre PHI commerciaux pour lesquels la concentration en anticorps anti-VapA avait été évaluée. Les sept autres ont étudié des plasmas non commerciaux produits sur 1 à 90 chevaux donneurs en utilisant des préparations antigéniques différentes (bactéries vivantes, bactéries tuées, protéines sécrétées incluant VapA, antigènes de paroi dont VapA, présence d'un adjuvant ou non) et des protocoles d'immunisation différents. Par ailleurs, les méthodes sérologiques (fixation du complément, immunodiffusion en gélose, ELISA) mises en œuvre pour évaluer le titre en anticorps anti-*R equi* de ces plasmas non commerciaux et les modalités d'expression des résultats sérologiques étaient différentes.

D'autres différences sont à souligner entre les douze publications :

- selon les études, l'effet préventif du PHI a été évalué dans le cadre d'infection expérimentale (7 publications) ou d'infection naturelle (essais terrain) (5 publications).
- selon les études, l'âge de la première administration de plasma (moins de 2j jusqu'à 60j), le nombre d'administrations (1, 2 ou 6), le volume injecté à chaque administration (50 ml, 150 ml, 300ml, 600ml, 1 litre...) ou au total (400 ml, 1l, 2l) et la voie d'administration (IV et/ou SC) étaient variables.

Deux autres études ont été recensées : une étude de terrain d'une durée de 5 ans réalisée dans un élevage où la maladie était enzootique et dont les résultats ont été présentés lors d'un congrès international avec actes (Muller et Madigan 1992) et une étude disponible sur internet réalisée par une société privée qui produit un PHI autorisé aux Etats-Unis (Brandon, Hill, et Wilson 2009).

Les différences, nombreuses et variées, entre ces travaux (produit administré, protocole de traitement, modalités d'infection, critères retenus pour l'évaluation de l'efficacité, puissance statistique ...) rendent particulièrement délicate toute comparaison des résultats obtenus.

Le bilan de ces résultats montre une absence de convergence.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2017-SA-0046**

**Tableau 1 : Bilan des études *in vivo* sur l'efficacité du plasma hyperimmun à prévenir la rhodococcose pulmonaire du poulain**

auteurs	mode d'infection	protocole d'administration : nombre - (dose voie) - âge	type de plasma	principaux critères mesurés (S ou NS)	conclusion des auteurs
(Martens <i>et al.</i> 1989)	expérimentale	2 (20 ml/kg IV) - 3j et 5j	non commercial	taux de mortalité (S)	capacité à contrôler l'évolution de la maladie
(Madigan, Hietala, et Muller 1991)	naturelle	1 (1litre IV) - entre 30 et 60 j	non commercial	incidence (S)	effet préventif si administré avant exposition
** (Muller et Madigan 1992)	naturelle	1 (1 litre IV) – âge moyen 3 à 6 semaines	non commercial	incidence (S)	effet préventif si administré avant exposition
(Hurley et Begg 1995)	naturelle	1 (1 litre IV) - ≤2 j	non commercial	incidence (NS)	aucun effet démontré
(Becu, Polledo, et Gaskin 1997)	naturelle	1 (300 à 1200ml selon titre Ac IV) - 4j uniquement si PTF 1 (600 à 1200ml IV) – 25j	non commercial	taux de mortalité (S) incidence (NS)	effet préventif en association avec la vaccination des juments
(Prescott <i>et al.</i> 1997)	expérimentale	1 (1 litre) – 1j	non commercial	numération bactérienne pulmonaire (S)	augmentation de la clairance pulmonaire de la bactérie
(Higuchi <i>et al.</i> 1999)	naturelle	1 (1-2 litres IV) – entre 10 et 39j	non commercial	incidence (NS)	aucun effet démontré
(Hooper-McGrevy <i>et al.</i> 2001)	expérimentale	1 (1 litre IV) – entre 18 et 23j	commercial	ratio poids pulmonaire/poids corporel (S) numération bactérienne pulmonaire (S)	capacité à limiter la sévérité des lésions pulmonaires
(Perkins <i>et al.</i> 2002)	expérimentale	1 (15ml/kg IV) - 14j	commercial	taux de mortalité (NS) score radiographique (NS) score clinique (NS)	effet préventif équivalent au plasma équin normal
(Giguère <i>et al.</i> 2002)	naturelle	2 (950ml IV) – entre 1 et 10j et entre 30 et 50j	commercial	incidence (NS)	aucun effet démontré
(Caston <i>et al.</i> 2006)	expérimentale	1 (1 litre IV) - 2j	commercial	score radiographique (S) score respiratoire (S) score lésionnel pulmonaire (NS)	capacité à limiter la sévérité des lésions pulmonaires
*(Brandon, Hill, et Wilson 2009)	expérimentale	1 (950ml)	commercial	délai apparition signes cliniques (S) score lésionnel pulmonaire (S) numération bactérienne pulmonaire (S)	capacité à contrôler l'évolution de la maladie
(Erganis <i>et al.</i> 2014)	expérimentale	6 (150ml IV puis 5x50ml SC) – 26j puis 29, 33, 37 et 45j	non commercial	taux de mortalité (NS) délai apparition signes cliniques (S) score lésionnel pulmonaire (NS)	effet préventif en association avec la vaccination des juments
(Sanz <i>et al.</i> 2016)	expérimentale	1 (20ml/kg IV) – ≤2j	commercial	incidence (NS) score échographique (S)	capacité à limiter la sévérité des lésions pulmonaires

\* publication internet : pas de comité de lecture

\*\* article issu des actes d'un colloque international avec comité de lecture

✓ Analyse des résultats des études *in vivo*

Dans certaines études, la transfusion de PHI obtenu à partir de chevaux donneurs immunisés avec des antigènes variés de *R. equi* entraîne chez les poulains, après une épreuve infectieuse expérimentale ou naturelle, une réduction significative de la morbidité et la mortalité (Becu, Polledo, et Gaskin 1997, Madigan, Hietala, et Muller 1991, Martens *et al.* 1989, Muller et Madigan 1992), de la sévérité des lésions pulmonaires évaluées par échographie (Sanz *et al.* 2016), radiographie (Caston *et al.* 2006) ou autopsie (Erganis *et al.* 2014, Hooper-McGrevy *et al.* 2001) ou du nombre de bactéries isolées des poumons (Brandon, Hill, et Wilson 2009, Hooper-McGrevy *et al.* 2001) (Tableau 1).

D'autres études n'ont pas mis en évidence de différence significative entre des poulains ayant reçu du PHI et des poulains témoins, pour des critères identiques (incidence des cas de bronchopneumonie, sévérité clinique ou lésionnelle) (Giguère *et al.* 2002, Higuchi *et al.* 1999, Hurley et Begg 1995, Perkins *et al.* 2002), que les poulains aient été infectés de façon expérimentale ou naturelle (Tableau 1).

Cependant, considérés dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'administration de PHI à des poulains pourrait être un moyen de prévenir la rhodococcose pulmonaire mais avec une incertitude élevée liée à leur hétérogénéité (Saisine 2013-SA-0122 - Rapport d'expertise collective – Groupe de travail « Alternatives aux antibiotiques »).

Par ailleurs, une méta-analyse conduite en 2005 (Giguère et Jacks 2005) montre un effet global de prévention de la maladie par administration du PHI avec un odds ratio de 4,6 et un intervalle de confiance à 95% de [1,1 – 19] ( $p < 0.05$ ).

La seule publication (Chaffin *et al.* 1991) ayant étudié l'effet thérapeutique d'un PHI non commercial n'a pas montré de résultats significatifs.

## ✓ Facteurs influant sur l'efficacité du PHI

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influer sur l'efficacité observée d'un PHI ; ils sont reliés à la fois aux modalités de production et d'administration du PHI mais également aux caractéristiques de l'élevage et des animaux.

L'efficacité d'un PHI peut être affectée par la dose administrée, le moment d'administration, le niveau de compétence de l'immunité innée, les pratiques d'élevage et la pression d'infection par des bactéries virulentes de l'environnement (Dawson *et al.* 2010).

- Echecs liés aux caractéristiques du PHI

Un certain nombre d'échecs rapportés dans la littérature peuvent résulter de l'utilisation d'un plasma de mauvaise qualité, soit parce que la concentration en anticorps spécifiques anti-*R. equi* est insuffisante, soit parce que les concentrations en anticorps anti-VapA ou anti-VapC sont insuffisantes.

La production d'un plasma de mauvaise qualité peut être liée à un mauvais choix des souches vaccinales, en particulier à l'utilisation de souches qui ont perdu leur plasmide de virulence au cours des manipulations, à une dose vaccinale et/ou un adjuvant inappropriés et éventuellement aux caractéristiques immunitaires du donneur (Dawson *et al.* 2010, Muscatello 2012).

Le rôle possible de l'adjuvant est souligné par les résultats de l'étude de Cauchard *et al.* de 2004 (Cauchard *et al.* 2004) : les juments immunisées avec des bactéries entières tuées par le formol présentent une élévation des anticorps anti-*R. equi* par rapport à des juments témoins, mais bien plus faible que celle observée chez des juments vaccinées avec une préparation antigénique associée à un adjuvant nanoparticulaire.

Bien que ces données soient controversées, les concentrations relatives en IgGa et IgGb *versus* IgG(T) pourraient également intervenir dans le degré de protection conféré par le PHI (Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2003, Lopez *et al.* 2002, Takai *et al.* 2002).

Par ailleurs, des travaux récents ont souligné des différences notables entre des PHI commercialisés aux USA, mais également entre les lots d'un même produit commercial. Ainsi, l'étude de Sanz et al., de 2014 (Sanz *et al.* 2014) a évalué les IgG totales spécifiques anti-VapA ainsi que les sous-classes d'IgGa, IgGb et IgG(T) anti-VapA dans 4 PHI commercialisés aux USA et a montré une absence de différence significative pour les IgG totales et les IgGb. En revanche, des différences significatives ont été détectées pour les IgGa et les IgG(T), ces dernières étant en faible quantité dans les 4 produits. Outre la qualité variable des plasmas testés, des différences importantes entre les lots d'un même PHI commercial ont été mises en évidence pour les IgG totales et les 3 sous-classes d'IgG (Cesar *et al.* 2016, Sanz *et al.* 2014).

Ces variations qualitatives ont pu contribuer à la production de résultats divergents lors d'essais *in vivo* testant l'efficacité de PHI commerciaux de composition théoriquement proche.

- Echecs liés aux erreurs d'administration et aux pratiques d'élevage

L'absence d'effet préventif peut être dû à une administration du PHI après une exposition importante à *R. equi* (Giguère et Prescott 1997, Muller et Madigan 1992) ou à un taux insuffisant d'anticorps protecteurs au moment de l'infection en raison de la décroissance au cours du temps des anticorps transmis passivement (Giguère et Prescott 1997, Heidmann, Madigan, et Watson 2006). Pour maximiser les chances d'efficacité d'un PHI de bonne qualité, le moment ou les moments de son administration au poulain sont donc un point critique : en effet, il faut éviter des taux insuffisants d'anticorps ou d'autres éléments plasmatiques protecteurs lorsque l'exposition infectieuse par aérosol se produit (Dawson *et al.* 2010).

L'échec de l'effet préventif du PHI peut aussi être consécutif aux pratiques d'élevage. L'efficacité d'un PHI sera réduite ou supprimée si les poulains traités et non traités sont mélangés ou si les animaux traités sont laissés dans un environnement où le risque de transmission par aérosol de *R. equi* virulents est très élevé comme des écuries poussiéreuses, des paddocks ou des prairies comportant des aires dépourvues de couverture herbeuse en présence d'une forte densité d'animaux (Dawson *et al.* 2010).

✓ Méthodes de contrôle de la qualité des PHI

Des méthodes sérologiques variées ont été mises en œuvre pour évaluer la qualité des PHI lors d'essais d'efficacité *in vivo*.

Ce sont principalement des méthodes ELISA (Brandon, Hill, et Wilson 2009, Dawson *et al.* 2010, Hietala, Ardans, et Sansome 1985, Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2003, Prescott *et al.* 1996, Takai, Kawazu, et Tsubaki 1985). Seuls Becu et coll. (Becu, Polledo, et Gaskin 1997) ont utilisé le test de fixation du complément et l'immunodiffusion en gélose (AGID).

Ces ELISA ont évalué les titres en anticorps anti-*R. equi* (Hietala, Ardans, et Sansome 1985, Takai, Kawazu, et Tsubaki 1985) ou plus spécifiquement en anticorps anti-VapA (Brandon, Hill, et Wilson 2009, Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2003, Prescott *et al.* 1996). Le plus souvent, la densité optique définissant un échantillon positif était déterminée par rapport à la densité optique d'un sérum contrôle négatif, dilué ou non (Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2003, Prescott *et al.* 1996).

Ces méthodes différaient, entre autres, par la composition des antigènes utilisés (antigènes capsulaires dont des polysaccharides, protéines membranaires de surface, protéines sécrétées ...) et par les sérums choisis comme contrôle négatif ou positif. Ainsi, les résultats obtenus par ces diverses méthodes ne peuvent pas être comparés ; de même, il n'est pas possible de considérer que des PHI commerciaux qui revendiquent des titres ELISA en anticorps anti-VapA comparables, présentent réellement des concentrations identiques en IgG anti-VapA.

Seuls Brandon et al., (Brandon, Hill, et Wilson 2009) proposent une méthode ELISA permettant de mesurer la concentration du PHI en anticorps anti-VapA. Des anticorps anti-VapA provenant de plasmas équins ont été purifiés par chromatographie d'affinité. Une solution de concentration connue (en mg/ml) a été préparée à partir de ces anticorps et a servi à établir une courbe standard. Les concentrations en anticorps anti-VapA ( $\mu\text{g/ml}$ ) des plasmas à tester ont été déterminées par comparaison avec les valeurs de la courbe. Selon cette méthode, un PHI efficace contiendrait 400  $\mu\text{g/ml}$  d'anticorps anti-VapA.

Bien que les résultats obtenus pour les plasmas testés restent dépendants de la qualité réelle de la solution de calibration utilisée, les méthodes qui permettent l'obtention de résultats quantitatifs semblent plus adaptées à l'évaluation de la qualité des PHI et à la comparaison de la qualité de divers PHI.

### 3. Inconvénients et effets secondaires de l'administration des PHI

L'utilisation des PHI comporte plusieurs inconvénients : d'une part, ils sont coûteux aussi bien à l'achat (pour les PHI commerciaux) qu'à la production, et d'autre part, leur modalité habituelle d'administration est particulièrement chronophage (temps de perfusion long) et contraignante. La nécessaire contention du poulain peut être à l'origine de traumatismes (Cohen, Chaffin, et Martens 2002, Giguère *et al.* 2011).

De plus, des réactions associées à la transfusion sont décrites. Elles sont d'intensité variable. Une réaction systémique de type anaphylactique est la forme la plus sévère de réaction allergique à la transfusion ; elle apparaît après administration de quelques millilitres de plasma et se traduit par des coliques, de la diarrhée, un œdème du larynx, de l'hypotension, un état de choc, une arythmie cardiaque voire un arrêt cardiaque et une perte de conscience. La fièvre est typiquement absente. D'autres réactions, de moindre intensité, ont été observées qui sont caractérisées par de la fièvre, une tachycardie, une tachypnée ou des coliques (Hardefeldt, Keuler, et Peek 2010).

Hardefeldt *et al.* (Hardefeldt, Keuler, et Peek 2010) ont analysé la fréquence des réactions indésirables suite à la transfusion de 2 plasmas équins commerciaux chez 69 poulains dont 62 âgés de moins de 7 jours. Une réaction a été observée chez 9,7% des poulains de moins de 7 jours et aucun cas d'anaphylaxie n'a été constaté. Le signe clinique le plus fréquent était la fièvre (67% des cas) devant la tachycardie, la tachypnée et les coliques. Muller et Madigan en 1992 (Muller et Madigan 1992) ont enregistré 3 réactions sévères (collapsus) mais non mortelles sur 520 poulains transfusés (soit une fréquence de 0,6%).

Enfin, la survenue d'une nécrose hépatique aiguë (ou maladie de Theiler), décrite chez des chevaux adultes dans les 6 mois suivant une transfusion de plasma, demeure un phénomène très rare (Aleman *et al.* 2005)

**Conclusion :** *Selon la littérature, suite à une transfusion de plasma à des poulains, des effets secondaires légers à modérés sont observés dans environ 10% des cas et des réactions graves dans moins de 1% des cas. Les inconvénients de l'administration de PHI sont également associés au coût du produit et aux contraintes des modalités d'administration.*

#### 3.3.3.2. Recommandations sur le choix du PHI et des modalités d'administration

Du fait du coût, des contraintes en temps de travail et des risques sanitaires pour les poulains, l'administration de PHI devrait être plutôt réservée à des poulains de valeur hébergés dans des élevages où la maladie sévit de façon enzootique.

Certains auteurs préconisent la réalisation d'une étude coût-bénéfice précise pour chaque élevage, sur la base d'un arbre de décisions (Cohen, Chaffin, et Martens 2002).

### 1. Critères de choix du PHI et conditions de production

L'utilisation de plasma équin standard n'est pas recommandée (Giguère et Prescott 1997). En revanche, les PHI présentant des concentrations élevées en anticorps anti-VapA et VapC seront privilégiés.

Il n'existe pas actuellement de consensus sur les modalités d'immunisation des chevaux adultes donneurs de plasma mais l'immunisation des donneurs avec une souche virulente, c'est-à-dire possédant le plasmide de virulence et exprimant les protéines Vap dont VapA, est indispensable.

Les chevaux donneurs doivent répondre à des critères sanitaires afin d'éviter la diffusion de maladies infectieuses via leur plasma, et également être exempts d'anticorps dirigés contre les hématies des divers groupes sanguins équins.

Ainsi, les auteurs recommandent l'administration de plasmas commerciaux même si des variations de composition entre les lots sont observées. En effet, ils assurent une relative garantie de composition, de pureté et de sécurité microbiologique (absence d'agents pathogènes) (Giguère *et al.* 2011) et de compatibilité quel que soit le groupe sanguin du receveur.

### 2. Mode d'administration

Il faut rappeler que si un PHI obtenait une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France, les modalités d'administration seraient nécessairement celles indiquées dans le RCP (résumé sur les caractéristiques du produit) fourni par le titulaire de l'AMM (voir chapitre 3.5).

En l'absence de produit disposant d'une AMM en France, les seules recommandations disponibles actuellement sont celles formulées par les principaux spécialistes de la maladie.

Même si l'administration de PHI par voie veineuse (transfusion) est la seule recommandée par les spécialistes de la maladie, la voie digestive (sondage naso-oesophagien ou naso-gastrique) semble être également employée dans les élevages.

#### ✓ Administration par transfusion

L'administration de PHI doit impérativement avoir lieu avant infection : 1 litre sera transfusé dans les deux premiers jours de vie (20ml/kg) (Cohen 2014a). Cependant, l'administration précoce de PHI peut aboutir à un taux insuffisant d'anticorps protecteurs à un moment où les poulains sont encore sensibles à l'infection et où le risque est élevé. Aussi, est-il recommandé d'administrer une seconde dose d'1 litre de plasma à environ 3 semaines d'âge (entre 2 et 4 semaines) (Giguère *et al.* 2011).

Si l'administration de PHI de bonne qualité, c'est-à-dire riche en IgG anti-VapA, entraîne bien une augmentation sérique significative des IgG anti-VapA chez les poulains qui le reçoivent, il faut souligner cependant une grande hétérogénéité des concentrations d'anticorps spécifiques mesurées chez ces poulains (Sanz *et al.* 2014).

Ces recommandations ne sont que des règles générales. Il est important de garder en mémoire que les moments les plus adaptés pour l'administration du PHI peuvent varier selon la localisation géographique de l'élevage et donc les caractéristiques climatiques, la pression infectieuse et les pratiques d'élevage dont notamment, le calendrier des naissances.

Ainsi, par exemple, pour les poulains nés tôt dans l'année (janvier, février) dans des régions géographiques où les températures hivernales préviennent une exposition environnementale, une seule administration de PHI (par transfusion) au début de la saison chaude pourrait être suffisante (Giguère et Prescott 1997).

#### ✓ Administration par sondage naso-oesophagien ou naso-gastrique

L'administration par sondage naso-oesophagien ou naso-gastrique est utilisée par certains éleveurs pour éviter les contraintes liées à la transfusion, notamment une contention du poulain de longue durée et/ou une sédation.

Outre l'âge d'administration qui est le facteur principal conditionnant la perméabilité intestinale aux macromolécules chez le poulain, d'autres facteurs pouvant influencer favorablement l'absorption des immunoglobulines ont été décrits chez le veau et le poulain : tétée naturelle, présence de la mère, absence d'état de prématurité ou immaturité, absence de stress (le stress induisant un taux élevé de corticoïdes) (Vivrette 2001). Cependant, même lorsque les conditions sont favorables, le niveau d'absorption intestinale des immunoglobulines semble limité, de l'ordre de 57% (Raidal, McTaggart, et Penhale 2005). Chez le veau, ce niveau d'absorption varierait de 12 à 65% selon les études (Vivrette 2001).

Aucune étude n'a comparé les concentrations sanguines d'anticorps spécifiques anti-*R. equi* obtenues suite à une administration de PHI par sondage nasogastrique effectué dans les 12 premières heures de vie avec les concentrations obtenues par transfusion d'un même plasma au cours de la même période. En revanche, cette comparaison a été faite pour des doses d'IgG équines purifiées, administrées à des poulains privés de colostrum juste après la naissance, soit par voie orale, soit par voie veineuse. Les résultats montrent qu'il faut au moins doubler la dose administrée *per os* pour atteindre une concentration sanguine d'IgG (mg/dl) équivalente à celle obtenue par la voie veineuse (2 x 10g/15 kg de poids vif *versus* 10g/15 kg de poids vif) (Franz *et al.* 1998).

Il en découle que l'administration de PHI par sondage naso-gastrique ou naso-oesophagien dans les 12 premières heures de vie du poulain ne saurait être recommandée d'autant plus que, pour assurer une protection, ni le taux sanguin minimal d'IgG spécifiques à atteindre chez les poulains, ni la concentration optimale d'IgG spécifiques en µg/ml du PHI administré par transfusion, ne sont connus.

#### 3.3.3.3. Conclusion - questions de recherche et de développement

Bien que les PHI ne confèrent qu'une protection partielle vis-à-vis de la rhodococcose, que leur protocole d'administration (transfusion) soit contraignant, avec des effets indésirables possibles, leur utilisation peut être recommandée comme moyen de prévention de la maladie chez des poulains de valeur soumis à un risque élevé d'infection. Cependant, pour préserver voire améliorer l'efficacité des PHI, il est nécessaire :

- de conduire, pour chaque élevage, une analyse afin de définir quels sont les moments d'administration les plus adaptés compte tenu des caractéristiques de l'élevage et des animaux,
- d'instaurer ou de maintenir une surveillance clinique étroite des poulains à risque,
- de mettre en place des mesures sanitaires permettant une réduction de l'exposition à la bactérie, tant en fréquence qu'en intensité (moindre concentration de *R. equi* en aérosol).

L'état des connaissances scientifiques actuelles montre que des efforts de recherche importants doivent être conduits pour permettre une amélioration du niveau de protection contre la rhodococcose conféré par les PHI.

Les études devront porter sur les domaines et questions suivantes :

- **La qualité et la composition du PHI**
  - Quelle est la concentration optimale en µg/ml des anticorps totaux anti-VapA et anti-VapC ;
  - Quel est l'équilibre optimal entre les 3 isotypes d'IgG (IgGa, IgGb et IgG(T)) ;
  - Quels sont les facteurs sanguins (autres que les anticorps) qui jouent un rôle dans la protection conférée par le PHI et à quelles concentrations.
- **Les conditions de production du PHI**
  - Sur quels critères (caractéristiques immunitaires) fonder le choix d'un donneur de PHI ;

- Quelle est la préparation idéale pour l'immunisation du cheval donneur (choix de la solution antigénique et de l'adjuvant) et quel protocole d'immunisation mettre en œuvre (voie d'administration, dose, nombre d'administrations) pour obtenir des concentrations plasmatiques optimales en anticorps et autres facteurs sanguins.
- Etudier l'intérêt d'enrichir les PHI obtenus chez des chevaux donneurs adultes avec des anticorps monoclonaux anti-VapA et anti-VapC
- Bien que le rôle protecteur des anticorps anti-VapA et anti-VapC dans la protection des poulains vis-à-vis de la rhodococcose ait été démontré (Hooper-McGrevy *et al.* 2001, Prescott *et al.* 1997), l'intérêt de l'utilisation à cette fin des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines VapA et VapC n'a pas été exploré. En effet, les premiers anticorps monoclonaux anti-VapA ont été produits en 1993 (Takai *et al.* 1993) et, par la suite, ont été principalement utilisés pour mettre en évidence des bactéries virulentes chez le poulain, dans le liquide de lavage trachéal (Anzai *et al.* 1997) ou sur des coupes de tissu pulmonaire, par immunohistochimie (Madarame *et al.* 1996, Sönmez et Gürel 2013, Sönmez, Gürel, et Takai 2011).

L'enrichissement des plasmas hyperimmuns obtenus chez des donneurs équins adultes avec des quantités connues d'anticorps monoclonaux anti-VapA et anti-VapC pourrait être envisagé de manière à, d'une part, garantir des concentrations de ces anticorps suffisantes et efficaces dans les PHI et, d'autre part, apporter au poulain l'ensemble des autres facteurs plasmatiques (anticorps dirigés contre des antigènes non-Vap et facteurs autres que des anticorps) qui contribuent à la protection contre la maladie.

Il est bien évident que cette méthode ne pourra être mise en œuvre, et son intérêt vérifié, que lorsque les concentrations optimales en anticorps anti-Vap A et anti-VapC à atteindre dans les PHI et dans le sang du poulain, après administration de PHI, seront déterminées.

- **Les conditions d'administration au poulain et les caractéristiques de l'immunité passive à atteindre**
  - Quelle est la concentration sanguine minimale en anticorps anti-VapA et anti-VapC à maintenir chez le poulain pendant toute la période à risque ;
  - Quel est le protocole d'administration du PHI le plus adapté pour obtenir ce résultat.

Par ailleurs, en matière de développement, des travaux seraient à conduire pour :

- définir un standard de qualité des PHI reposant sur des critères de composition et des critères garantissant leur innocuité,
- mettre au point les méthodes nécessaires au contrôle de la qualité des PHI, notamment des méthodes sérologiques permettant de vérifier qualitativement et quantitativement la composition en anticorps des PHI.

### 3.3.4. Vaccins et vaccination contre la rhodococcose

#### 3.3.4.1. Etat des connaissances

De nombreuses études ont été réalisées pour développer un vaccin efficace contre la rhodococcose du poulain (Giles *et al.* 2015). A ce jour, aucun vaccin conventionnel n'est disponible commercialement (le cas des autovaccins sera traité plus loin). Le caractère intra-cellulaire de *R. equi*, les spécificités du système immunitaire chez le poulain nouveau-né et la présence potentielle d'anticorps maternels représentent des écueils significatifs pour le développement d'un vaccin immunogène et protecteur. L'évaluation et le développement de vaccins expérimentaux contre *R. equi* souffrent également du manque de modèle animal disponible (limitation du modèle murin) et également des difficultés associées à l'utilisation de l'hôte naturel (par exemple, niveau de sensibilité à l'infection par *R. equi*, corrélation entre la dose infectieuse et l'âge du poulain). Les

stratégies de vaccination expérimentées regroupent l'immunisation du poulain nouveau-né, l'immunisation de la jument gravide avec transfert d'immunité au poulain, et une combinaison des 2 approches précédentes. Différents types de vaccins ont été expérimentés (vaccin à bactéries vivantes atténuées, complet à bactéries inactivées, sous-unitaire, ADN) et le bilan des études chez l'espèce cible est présenté dans le tableau 2, le détail de ces études étant repris en Annexe 2.

#### 1. Vaccin à bactéries vivantes atténuées (Annexe 2, section 1)

Un vaccin vivant atténué contient une forme atténuée mais infectieuse de l'agent pathogène. L'infection de l'hôte par la souche vaccinale atténuée au cours de la vaccination va être limitée. Elle a pour but d'induire une réponse immunitaire proche de celle induite au cours de l'infection naturelle sans toutefois induire les signes cliniques de la maladie. La survie dans l'organisme de la souche vaccinale atténuée est sensée être très limitée. Toutefois, une multiplication et une excrétion réduites de la souche vaccinale peuvent être observées. De nombreux essais cliniques et études utilisant des souches vivantes atténuées de *R. equi* ont été réalisés au cours des 30 dernières années (Chirino-Trejo, Prescott, et Yager 1987, Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2005, Jacobs *et al.* 2012, Lopez *et al.* 2008, Martens, Martens, et Fiske 1991, Pei *et al.* 2006, Pei *et al.* 2007, Van der Geize *et al.* 2011). L'utilisation d'une souche possédant le plasmide de virulence est nécessaire. Les résultats d'études précédant sa mise en évidence en 1995 (Tan *et al.* 1995) peuvent donc être biaisés en fonction de la souche de *R. equi* utilisée au cours de ces études. Les méthodes et stratégies d'atténuation sont multiples (atténuation par passage et délétion de gènes par exemple). Au-delà des questions d'innocuité des souches vaccinales vivantes atténuées (immunisation d'animaux immunodéprimés par exemple), le risque de réversion à une forme virulente est également à prendre en considération. Les résultats en termes de protection sont en général limités et/ou contradictoires.

#### 2. Vaccin complet à bactéries inactivées (Annexe 2, section 2)

Ces vaccins contiennent une forme inactivée (traitement chimique ou par irradiation) de *R. equi*. (Bordin *et al.* 2014, Rocha *et al.* 2016, Varga *et al.* 1997). Il semble que l'immunogénicité de ce type de vaccin soit limitée. Les résultats de protection du poulain contre la rhodococcose sont également peu concluants. Le cas particulier des autovaccins contre la rhodococcose (suspension à base de bactéries inactivées, correspondant donc au même concept, mais à partir d'un prélèvement spécifique pour chaque élevage) sera traité en section 3.3.4.

#### 3. Vaccin sous-unitaire (Annexe 2, section 3)

Un vaccin sous-unitaire contient un ou plusieurs antigènes de l'agent pathogène cible. Les vaccins sous-unitaires ont donc généralement un très bon niveau d'innocuité. Toutefois, l'emploi d'un adjuvant est nécessaire pour induire la ou les réponses immunitaires adaptées à l'agent pathogène ciblé. La protéine VapA reste à ce jour l'antigène cible principal des vaccins de type sous-unitaire, induisant une réponse immunitaire humorale. Toutefois, l'existence d'autres antigènes (protéiques ou lipidiques) capables d'induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire et impliqués dans les mécanismes de protection contre *R. equi* est probable (Barbey *et al.* 2009). La majorité des essais cliniques réalisés ont eu pour but d'évaluer l'immunogénicité de ces approches vaccinales (Becu, Polledo, et Gaskin 1997, Cauchard *et al.* 2004, Cauchard *et al.* 2006, Cauchard *et al.* 2014, Kaur *et al.* 2013, Lohmann *et al.* 2013, Prescott *et al.* 1997, Stephenson 2015). Les vaccins sous-unitaires semblent démontrer une bonne immunogénicité. Les résultats en termes de protection sont encourageants.

#### 4. Vaccin ADN (Annexe 2, section 4)

La vaccination ADN correspond à l'administration d'un vaccin constitué d'un vecteur plasmidique contenant un ou plusieurs gènes codant pour les antigènes de l'agent pathogène cible, parfois associé à des gènes codant pour des molécules immuno-stimulatrices comme les cytokines. Les vaccins ADN contre la rhodococcose codent pour la protéine VapA. Les résultats actuels semblent

indiquer une absence d'immunogénicité de ce type de vaccin (Lopez *et al.* 2003, Mealey *et al.* 2007).

#### 5. Autres approches vaccinales

Les Dr N. Cohen (Texas A&M University) et Pr G. Pier (Harvard Medical School) ont récemment présenté des résultats préliminaires obtenus avec une nouvelle approche vaccinale nommée PNAG (poly beta1-6-N-acetyl glucosamine). Les PNAG sont des polysaccharides conservés présents à la surface de nombreuses espèces de bactéries. A l'état naturel, les anticorps dirigés contre les PNAG sont peu protecteurs. Toutefois, ces polysaccharides peuvent être modifiés (déacétylation) afin d'augmenter de manière significative le caractère protecteur des anticorps anti-PNAG. Le vaccin PNAG est donc considéré comme étant un vaccin de type « universel » qui a pour vocation de cibler de nombreux agents pathogènes. Le vaccin PNAG semble avoir été testé contre *R. equi* et des résultats préliminaires ont été présentés à l'occasion du groupe de travail « Gourmes » (Havemeyer fondation workshop, Montana (USA)) en septembre 2017. Le Dr N. Cohen rapporte un essai de vaccination de juments gravides suivi d'une infection expérimentale des poulains par *R. equi*. Le taux de protection des poulains vaccinés semble avoir atteint 92 % (11 poulains sur 12) contre seulement 14 % de protection chez les poulains témoins. Ces résultats ne sont pas encore publiés.

L'herpèsvirus équin de type 2 (HVE-2, gammaherpèsvirus) a été identifié comme un facteur potentiel de prédisposition à l'infection par *R. equi* et/ou au développement de la forme clinique de la maladie. L'utilisation d'un vaccin expérimental HVE-2 de type sous-unitaire (glycoprotéines virales + ISCOM; Immuno-Stimulating-Complex) semble avoir réduit la prévalence des pneumonies induites par *R. equi* (Belák *et al.* 1980, Nordengrahn *et al.* 1996). Le virus HVE-2 déploie plusieurs mécanismes d'évasion de la réponse immunitaire. HVE-2 exprime des gènes codant pour un homologue de l'IL10 ainsi que 3 récepteurs protéiques homologues (vGPCR : viral G protein-couple receptor ; E1, ORF74 et E6) capables d'interagir avec des chémokines et ainsi de modifier la réponse immunitaire en faveur de l'agent pathogène (information passée en revue dans (Paillot *et al.* 2009). De plus, l'infection de cellules mononucléées du sang périphérique par HVE-2 est associée avec une diminution de l'expression de la molécule CCL2 (molécule chimioattractive des monocytes) (Dunowska *et al.* 2001).

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2017-SA-0046**

**Tableau 2 : Bilan des études *in vivo* chez l'espèce cible sur l'immunogénicité et l'efficacité des vaccins expérimentaux contre la rhodococcose pulmonaire du poulain**

Auteurs	Type de vaccin	Antigène/Souche vaccinale	Adjuvant	Animal cible - âge	protocole d'administration : nombre - (dose voie) - âge/fréquence	principaux critères mesurés	conclusion des auteurs
(Chirino-Trejo, Prescott, et Yager 1987)	Vivant atténué.	Souche clinique (2325-85) atténuée.	Aucun	Poulains - 1-3 semaines	3 groupes de 3, (vaccination orale, 4 administrations séparées d'une semaine).	Protection, challenge 3 semaines après dernière immunisation.	Réduction des signes cliniques et charge bactérienne pulmonaire après vaccination.
(Martens, Martens, et Fiske 1991)	Vivant.	Souche clinique TVMDL 007 (non atténuée).	Aucun	Juments gravides	2 groupes de 6 (vaccination sous-cutanée, 3 à 5 administrations).	Protection, challenge des poulains (7 jours après naissance).	Pas de différence en termes de protection.
(Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2003)	Vivant.	Souche ATCC 33701.	Aucun	Poulains nouveau-nés	2 groupes de 3 et 4, respectivement (vaccination orale, 3 administrations). 2 <sup>ème</sup> , 7 <sup>ème</sup> et 14 <sup>ème</sup> jours.	Protection, challenge 1 semaine après dernière immunisation.	Protection contre les signes cliniques de la maladie dans le groupe vacciné.
(Pei <i>et al.</i> 2007)	Vivant atténué.	Souche 103+ ( <i>choE</i> - et <i>icl</i> -).	Aucun	Poulains – 1 semaine	5 poulains (administration intra-bronchiale).	Protection, challenge 2 semaines après immunisation.	Protection clinique pour 3 des 5 poulains.
(Lopez <i>et al.</i> 2008)	Vivant atténué.	Souche R. equi ( <i>rib</i> -).	Aucun	Poulains	Administration intra-pulmonaire.	Protection.	Pas de protection.
(Van der Geize <i>et al.</i> 2011)	Vivant atténué.	Souche R. equi ( <i>RE1ΔpdAB</i> -).	Aucun	Poulains – 2 à 4 semaines	2 groupes de 4 (administration orale, 2 administrations séparées de 2 semaines).	Protection, challenge des poulains (2 semaines après dernière immunisation).	Réduction des signes cliniques dans le groupe vacciné (seulement 2 poulains affectés).
(Jacobs <i>et al.</i> 2012)	Vivant atténué.	Souche RG2837 ( <i>ΔipdABipdAB2</i> ).	Aucun	Poulains – 1 semaine	Administration orale, 1 ou 2 administrations.	Protection, challenge des poulains (3 semaines après dernière immunisation).	Résultats inconsistants.
(Jacobs <i>et al.</i> 2012)	Vivant atténué.	Souche RG2837 ( <i>ΔipdABipdAB2</i> ).	Aucun	Poulains – 5 mois	Administration intra-rectale.	Protection, challenge des poulains.	Meilleure protection.
(Jacobs <i>et al.</i> 2012)	Vivant atténué.	Souche RG2837 ( <i>ΔipdABipdAB2</i> ).	Aucun	Poulains – 1 semaine	2 administrations intra-rectales à 1 jour d'écart.	Protection, challenge des poulains (3 semaines après dernière immunisation).	Protection significative.
Brevet EP2385836B1*	Vivant atténué.	Souche RG2837 ( <i>ΔipdABipdAB2</i> ).	Aucun	Poulains – 2 à 4 semaines	4 groupes de 4 (2 administrations orales à 2 semaines d'écart).	Protection, challenge des poulains (2 semaines après dernière immunisation).	Réduction des signes cliniques chez 10/12 des poulains vaccinés.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2017-SA-0046**

(Varga <i>et al.</i> 1997)	Inactivé.	Souche <i>R. equi</i> serotype 1 seule ou en combinaison avec EHV-2.	Sels d'aluminium	Juments gravides et leur poulain	1 groupe de 24 (combo), 1 groupe de 14 (monovalent) et 12 contrôles (administration intramusculaire, 6 <sup>ème</sup> et 4 <sup>ème</sup> semaines avant mise bas) et poulains, 3 <sup>ème</sup> , 5 <sup>ème</sup> et 7 <sup>ème</sup> semaines après la naissance.	Protection, taux de prévalence naturel de la maladie.	Faible immunogénicité des vaccins, mais prévalence réduite chez les poulains vaccinés.
(Bordin <i>et al.</i> 2014)	Inactivé (eBeam).	Souche EIDL 5-331	± toxine cholérique	Poulains nouveau-nés	3 groupes de 9 à 10 (4 administrations entérales), 2 <sup>ème</sup> , 9 <sup>ème</sup> , 16 <sup>ème</sup> et 23 <sup>ème</sup> jours.	Immunogénicité. Pas de challenge.	Immunogénicité confirmée.
(Rocha <i>et al.</i> 2016)	Inactivé (eBeam).	Souche EIDL 5-331	Toxine cholérique	Poulains nouveau-nés	8 poulains vaccinés (3 administrations orales), 2 <sup>ème</sup> , 7 <sup>ème</sup> et 14 <sup>ème</sup> jours. 4 poulains contrôles.	Protection (challenge au 21 <sup>ème</sup> jour).	Vaccin peu immunogénique, pas de différence en termes de protection.
(Prescott <i>et al.</i> 1997)	Sous-unitaire.	VapA.	Hydroxyde d'aluminium	Juments gravides et leur poulain	1 groupe de 8 et 1 groupe de 6 (2 administrations intramusculaires), 3 <sup>ème</sup> et 5 <sup>ème</sup> semaines pour les poulains.	Protection, taux de prévalence naturel de la maladie.	Pas de protection, possibilité d'exacerbation chez les poulains vaccinés.
(Becu, Polledo, et Gaskin 1997)	Sous-unitaire	Antigènes solubles (incluant VapA).	Hydroxyde d'aluminium	Juments gravides	700 à 1200 juments gravides (45 <sup>ème</sup> et ou 30 <sup>ème</sup> et 15 <sup>ème</sup> jours avant mise bas).	Protection des poulains, taux de prévalence naturel de la maladie.	Mortalité réduite de 3% à 1.2%.
(Becu, Polledo, et Gaskin 1997)	Sous-unitaire	Antigènes solubles (incluant VapA).	Hydroxyde d'aluminium	Juments gravides (vaccination) et leur poulain (PHI seulement)	380 poulains (issus de juments gravides immunisées comme ci-dessus), PHI pour les poulains (4 <sup>ème</sup> et 25 <sup>ème</sup> jours).	Protection des poulains, taux de prévalence naturel de la maladie.	Mortalité réduite de 5.8% à 0.2%.
(Becu, Polledo, et Gaskin 1997)	Sous-unitaire.	Antigènes solubles (incluant VapA).	Hydroxyde d'aluminium	Juments gravides et leur poulain	33 poulains (juments vaccinées + PHI) 10 poulains (juments vaccinées, pas de PHI mais vaccination à 20 <sup>ème</sup> , 30 <sup>ème</sup> et 40 <sup>ème</sup> jours). 10 poulains contrôles.	Protection des poulains, taux de prévalence naturel de la maladie.	Pas de protection observée.
(Cauchard <i>et al.</i> 2004) Brevet FR 0408136 Brevet US 8,052,978 B2	Sous-unitaire.	VapA	Adjuvant nanoparticulaire (IMS3012)	Juments gravides	1 groupe de 24 juments gravides (VapA). 1 groupe de 8 juments gravides immunisées (vaccin inactivé). 16 juments non immunisées.	Protection des poulains, taux de prévalence naturel de la maladie.	Pas de cas chez les groupes vaccinés. 4/8 cas dans le groupe contrôle.
(Cauchard <i>et al.</i> 2006)	Sous-unitaire.	4 peptides VapA	Adjuvant nanoparticulaire (IMS3012)	Poulains	Immunisation intramusculaire.	Immunogénicité.	Réponse humorale mesurée.

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2017-SA-0046**

(Cauchard <i>et al.</i> 2014)	Sous-unitaire.	Cocktail protéique (ResP)	Adjuvant nanoparticulaire (IMS3012)	Poulains – 3 semaines	12 poulains (2 immunisations intramusculaires), 3 <sup>ème</sup> et 7 <sup>ème</sup> semaines.	Immunogénicité.	Réponse humorale mesurée.
(Stephenson 2015) Brevet US 2015/0023983 A1*	Sous-unitaire.	VapA+VapC, VapA ou VapC.	Adjuvant Carbigen™ (10% du volume total) Adjuvant à base de Carbopol® 934P, polymère à base d'acide polyacrylique	Juments gravides (vaccination) et leur poulain nouveau-né (PHI et vaccination) (Cohorte 2012)	1 groupe de 10 juments (2 immunisations, VapAVapC, dont la dernière 1 mois avant mise bas). 1 groupe de 11 juments (2 immunisations, VapA, dont la dernière 1 mois avant mise bas). 1 groupe de 10 juments (2 immunisations, VapC, dont la dernière 1 mois avant mise bas). Tous les poulains ont reçu un PHI (VapA+VapC (groupe 1), VapA (groupe 2) ou VapC (groupe 3) et le vaccin correspondant (VapA+VapC, VapA ou VapC), 8 <sup>ème</sup> , 12 <sup>ème</sup> et 16 <sup>ème</sup> semaines. Groupe contrôle de référence : 15 poulains.	Protection des poulains, taux de prévalence naturel de la maladie.	1 cas chez les poulains vaccinés, 11/15 chez les poulains contrôles.
(Stephenson 2015) Brevet US 2015/0023983 A1*	Sous-unitaire.	VapC.	Adjuvant Carbigen™ (10% du volume total)	Juments gravides (vaccination) et leur poulain (vaccination) (Cohorte 2011)	30 juments gravides (2 immunisations, VapC, dont la dernière 1 mois avant mise bas) 30 poulains (4 administrations), entre les 2 <sup>ème</sup> et 15 <sup>ème</sup> semaines. Groupe contrôle de référence : 15 poulains.	Protection des poulains, taux de prévalence naturel de la maladie.	0 cas chez les poulains vaccinés, 11/15 chez les poulains contrôles.
(Lohmann <i>et al.</i> 2013)	Sous-unitaire	VapA recombinant	CPG ODN 2395 (oligodésoxynucléotide à motif CpG, ligand du TLR-9)	Poulains nouveau-nés	8 poulains (2 administrations intramusculaires), 1 <sup>er</sup> et 15 <sup>ème</sup> jours. 7 poulains contrôles.	Protection, challenge des poulains (2 semaines après dernière immunisation).	Pas de différence en termes de protection.
(Lopez <i>et al.</i> 2003)	ADN	VapA	Aucun excepté l'immunisation protéique intradermale : RIBI adjuvant (MPL/TDM Ribi ; émulsion huile-dans-eau/squalene/Tween80)	Poulains – 1 à 2 semaines	Poulains (1 <sup>ère</sup> administration intranasale + intradermale), 8 <sup>ème</sup> ou 15 <sup>ème</sup> jours. (2 <sup>nd</sup> administration, ADN), 15 jours après V1. (3 <sup>ème</sup> administration, protéine), 30 jours après V1.	Immunogénicité.	Réponse humorale mesurée (faible).

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° 2017-SA-0046**

(Mealey <i>et al.</i> 2007)	ADN	VapA + IL12	IL12 plasmide	Poulains – 1 semaine	7 poulains (2 administrations : intratrachéale + intradermale), ≤7 jours. (2 <sup>nd</sup> administration, ADN), 15 jours après V1. (3 <sup>ème</sup> administration, protéine sans IL12), 30 jours après V1.	Immunogénicité.	Réponse humorale mesurée (faible).
(Cohen et Pier 2017)**	Autre.	PNAG	Aucune information disponible	Juments gravides et leur poulain	1 groupe vacciné de 12, 1 groupe contrôle.	Protection, challenge infectieux.	Protection des poulains vaccinés (91.6%) contre 14.3% dans le groupe contrôle.

\* publication internet : pas de comité de lecture

\*\* présentation orale, sans abstract ou publication.

### 3.3.4.2. Conclusion, questions de recherche et perspectives de développement

Malgré le design, le développement et la caractérisation de nombreuses stratégies de vaccination contre la rhodococcose au cours des 25 dernières années, ainsi que la mise en place de nombreuses études cliniques chez l'espèce cible (information revue et synthétisée dans le tableau 2), il n'y a à ce jour que peu ou pas de consensus sur la meilleure approche technologique à adopter pour prévenir l'infection par *R. equi* chez le jeune poulain. En conséquence, aucun vaccin contre la rhodococcose n'est disponible commercialement.

Cet état de fait est une conséquence de la complexité de cette pathologie. De nombreux éléments restent à définir, comme la sélection du ou des antigènes vaccinaux, l'ajout d'un adjuvant et sa nature, la méthode et la fréquence d'administration du vaccin, etc. Chacun de ces éléments doit être évalué en fonction de la stratégie vaccinale sélectionnée (vaccin à bactéries vivantes, à bactéries inactivées, sous-unitaire etc.), en fonction du type d'immunité recherché (stimulation d'une immunité mucoale, immunité spécifique humorale, immunité spécifique humorale et cellulaire, etc.) ainsi que de l'individu concerné par l'immunisation (jument gravide seule avec transfert d'immunité, jument gravide et poulain nouveau-né, poulain nouveau-né seul).

Outre ces éléments propres au vaccin, des difficultés majeures sont rencontrées pour leur évaluation, comme la complexité du modèle expérimental animal à utiliser, la paucité des corrélats de protection, l'impact certain de l'âge sur la réponse immunitaire et la protection contre *R. equi* mais dont les mécanismes restent encore mal compris et définis. L'impact de l'âge du poulain sur la réponse immunitaire humorale induite par la vaccination a été récemment illustré dans le cadre d'une étude terrain concernant l'immunisation de poulains pur-sang contre la grippe équine. Cette étude révèle que l'âge du poulain lors de sa première immunisation contre la grippe équine est un facteur pouvant influencer les taux d'anticorps induits par la vaccination (mécanismes indépendant de l'interférence entre les anticorps d'origine maternelle et certains vaccins grippaux). La cinétique des anticorps protecteurs mesurée dans le cadre de cette étude était sub-optimale chez les poulains ayant été immunisés à 4 mois d'âge, par rapport à celle mesurée chez des poulains immunisés à un âge de 6 mois ou plus (Fougerolle *et al.* 2016).

D'autres difficultés pour le développement d'un vaccin contre la rhodococcose sont à noter comme l'existence possible de différences individuelles en termes de sensibilité à l'infection et de développement des signes cliniques de la maladie, ou les facteurs environnementaux et les dynamiques de populations pour les études terrains.

En se basant sur la bibliographie spécifique à la rhodococcose explorée dans le cadre de cette saisine ainsi que sur l'état des connaissances des vaccins équins actuellement commercialisés ou en cours de développement, plusieurs conclusions et perspectives pour le développement d'un vaccin contre la rhodococcose se dégagent :

- A l'exception de rares publications dont les résultats seraient à confirmer, la littérature scientifique montre globalement que l'approche vaccinale à base de bactéries complètes inactivées n'est pas adaptée à *R. equi*. Les raisons principales sont une faible immunogénicité mesurée au cours des études réalisées, le risque d'interaction avec l'immunité transférée (colostrum, PHI) et des résultats peu prometteurs en termes de protection.
- L'approche vaccinale à base de bactéries vivantes atténuées, avec une administration par voie orale, a présenté des résultats encourageants. L'expérience acquise avec les vaccins vivants atténués contre la Gourme (*Streptococcus equi*) nous informe néanmoins que ce type de plateforme requière un équilibre précis entre les notions d'efficacité et d'innocuité. La persistance de l'agent vaccinal au site d'administration doit être suffisante afin d'assurer une prise en charge immunitaire. Toutefois, l'atténuation doit être finement dosée pour éviter les

complications secondaires (formation d'abcès ou transmission de la souche vaccinale par exemple).

- La stratégie de vaccination basée sur une sélection d'antigènes d'intérêts, dont VapA et VapC, a donné des résultats encourageants en termes d'immunogénicité chez la jument et le poulain, ainsi qu'une protection significative dans un contexte d'infection naturelle. Cette approche semble être à ce jour la plus prometteuse (en prenant en compte les questions d'immunogénicité, d'efficacité et d'innocuité). Le risque d'interaction avec l'immunité transférée reste un point à prendre en compte.
- L'emploi de vecteurs viraux recombinants exprimant un ou plusieurs antigènes d'intérêt est une approche vaccinale qui a fait ses preuves chez de nombreuses espèces, dont le cheval dans le cas de la grippe équine et la fièvre du Nil Occidental. Ce type de plateforme vaccinale pourrait également être évaluée dans le cadre de la rhodococcose.
- Enfin, *la proximité taxonomique et structurale de Rhodococcus equi* avec les mycobactéries, les homologues déjà mises en évidence avec *Mycobacterium tuberculosis* pour certains gènes (Rahman *et al.* 2003), ainsi qu'une activité antiphagocytaire faisant intervenir des mécanismes similaires (Fernandez-Mora *et al.* 2005, Sydor *et al.* 2013, von Bargen *et al.* 2009), pourraient suggérer la mise en œuvre de mécanismes communs d'interaction avec l'hôte sur le plan immunologique. Même s'il convient d'être très prudent à ce stade des connaissances, de nombreux mécanismes n'étant pas encore élucidés pour la rhodococcose, le développement d'un vaccin vis-à-vis de *R. equi* pourrait bénéficier des avancées attendues concernant l'amélioration des vaccins antituberculeux existant et le développement de nouveaux vaccins antituberculeux à usage vétérinaire (voir annexe 2).

Si le développement de vaccins efficaces contre la rhodococcose s'avère complexe d'un point de vue scientifique, ce n'est probablement pas la seule raison permettant d'expliquer l'absence de vaccins avec AMM dans l'Union européenne. La rhodococcose du cheval, comme bien d'autres pathologies animales, s'inscrit pleinement dans le concept « MUMS » (Minor Use, Minor Species) : aux yeux de l'industrie pharmaceutique vétérinaire, les investissements nécessaires (R&D, élaboration d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché, production proprement dite, taxes, frais liés à la distribution, ...) rendent peu attractif le développement d'un vaccin contre cette maladie. Le marché reste limité, même si la rhodococcose est considérée comme une maladie majeure dans l'espèce équine, le cheval étant déjà en soi considéré comme une espèce mineure au niveau européen (EMA/308411/2014 Adopted). Dès lors que le retour sur investissement est jugé trop faible, voire absent, les industriels n'envisagent pas de dégager les ressources nécessaires à un tel développement.

### 3.3.5. Autovaccins

#### 3.3.5.1. Etat des connaissances et situation en France

Compte tenu du principe des autovaccins et des modalités de leur obtention, le corpus bibliographique les concernant n'existe quasiment pas. Ainsi, l'ensemble des éléments ci-dessous provient des auditions des préparateurs d'autovaccins et des professionnels des filières équinnes.

En l'absence de vaccin disponible contre la rhodococcose, les autovaccins sont autorisés (cf 3.5).

Deux préparateurs en France détiennent aujourd'hui une autorisation pour préparer des autovaccins contre *Rhodococcus equi*.

La préparation d'un autovaccin est mise en œuvre sur prescription d'un vétérinaire qui opère les prélèvements *ad hoc* dans l'élevage atteint (matériau contenant les bactéries en cause), fait isoler ces bactéries et préparer un autovaccin, en vue de protéger les autres animaux de l'élevage (générations concomitantes ou successives).

La production d'un autovaccin est réalisée par les préparateurs autorisés, selon les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) auxquelles ils sont soumis et selon les prescriptions du vétérinaire en charge de l'élevage considéré.

Des auditions conduites par les experts, complétant les éléments bibliographiques, il ressort les points suivants :

### 1. Régions et élevages concernés

La demande d'autovaccins émane principalement de la Normandie, devant les Pays de la Loire et le reste du territoire français.

Cette pratique concerne moins d'une centaine d'élevages par an, 75% d'entre eux renouvelant leurs commandes chaque année.

### 2. Prélèvements et identification des souches bactériennes

Les vétérinaires prescripteurs sont en charge des prélèvements en élevage. Cette étape est déterminante puisque c'est à partir de ces prélèvements que les bactéries seront isolées pour préparer l'autovaccin. L'enjeu, à cette étape, est de parvenir à prélever la bactérie réellement responsable de la maladie identifiée dans l'élevage. Pour maximiser les chances d'obtenir une culture bactériologique positive de *Rhodococcus equi*, les prélèvements de choix sont : à l'autopsie, écouvillonnage de la coque d'un abcès pulmonaire ou mésentérique, ou de membrane synoviale dans le cas d'une arthrite septique ; sur un animal vivant malade, culture de liquide de lavage trachéal. Quand ce type de prélèvement n'a pas pu être réalisé, le prélèvement peut être effectué dans l'environnement des poulains. Dans tous les cas, et en particulier si le prélèvement est réalisé dans l'environnement, il est indispensable de vérifier le caractère pathogène de la bactérie isolée en recherchant le plasmide de virulence VapA par PCR.

Des questions sont posées aujourd'hui par les professionnels, en ce qui concerne la caractérisation des souches :

- ✓ Il existe différents plasmides de virulence chez *Rhodococcus equi*.

Le typage des différents plasmides permet-il d'orienter avec plus de pertinence le choix des souches à intégrer dans la préparation d'un autovaccin ?

Les souches de *R. equi* virulentes sont caractérisées par la présence d'un plasmide porteur d'un îlot de pathogénicité et qui présente une spécificité d'hôte. Trois types plasmidiques spécifiques d'hôte ont été identifiés : les plasmides circulaires pVAPA et pVAPB sont retrouvés respectivement dans les isolats équins et porcins (Letek *et al.* 2008) alors que le plasmide linéaire pVAPN est associé aux souches bovines (Valero-Rello *et al.* 2015). Les plasmides circulaires comportent une région conservée commune impliquée dans la conjugaison, la réplication/partition et une fonction inconnue et une région variable contenant l'îlot de pathogénicité qui code pour les protéines Vap.

Dans la plupart des souches équines, les plasmides ont une taille variant entre 80 et 90kb et codent pour la protéine de virulence VapA. De nombreuses études ont analysé la diversité des plasmides de virulence présents chez *R. equi* par diverses méthodes (RFLP, PCR).

Douze types plasmidiques différents ont été identifiés par RFLP à partir des isolats équins : 85 kb type I à IV, 87 kb type I à III et 90 kb type I à V. Trois types sont présents en France : les types 85 kb type I, 87 kb type I et 87 kb type II, les deux premiers étant les plus

fréquents (Duquesne *et al.* 2010, Takai *et al.* 1999). Ils sont retrouvés aussi bien dans l'environnement des chevaux que dans des lésions caractéristiques de rhodococcose chez des poulains (Duquesne *et al.* 2010, Shinji Takai *et al.* 2001, S Takai *et al.* 2001).

Aucune étude ne rapporte de différence de pouvoir pathogène entre les isolats équins en fonction du type plasmidique. L'étude de Duquesne *et al.* (2010) en particulier, portant sur 61 souches isolées de poulains autopsiés, n'observe pas de tropisme de tissu ou d'organe selon le type plasmidique.

Cette même étude a comparé la séquence nucléotidique du plasmide 87 kb type I (pVapA116) à celle du plasmide 85 kb type I (pVapA1037) et montré que la divergence entre les 2 plasmides ne porte pas sur l'îlot de pathogénicité (Duquesne *et al.* 2010). Plus globalement, le séquençage complet de 15 plasmides de type pVapA d'origine équine démontre une très forte conservation de l'îlot de pathogénicité (MacArthur *et al.* 2017).

Ainsi, les données scientifiques actuellement disponibles ne suggèrent pas, au contraire, que des différences de pouvoir pathogène puissent exister entre les souches de *R. equi* virulentes d'origine équine en fonction du type plasmidique. Au sein des plasmides pVapA, un type plasmidique plutôt qu'un autre ne peut donc être recommandé pour la production des autovaccins.

En revanche, le nombre de copies du plasmide présentes dans l'isolat ou la capacité de la souche à produire un grand nombre de copies du plasmide pourraient être des paramètres à explorer (Petry, communication personnelle).

- ✓ Plusieurs souches peuvent être isolées à partir des prélèvements effectués en élevage.

Au sein de la population de souches possédant le plasmide de virulence, il n'est pas possible aujourd'hui de caractériser ces différentes souches, d'identifier s'il s'agit du même clone ou de clones différents. Il n'y a donc pas d'éléments permettant de savoir s'il conviendrait d'inclure plusieurs de ces souches dans la préparation de l'autovaccin, pour gagner en pertinence.

Duquesne *et al.* (Duquesne *et al.* 2017) ont développé un outil de typage moléculaire basé sur la méthode MLST (*multilocus sequence typing*) et fondé sur le séquençage de 7 gènes constitutifs, dits de ménage, distants les uns des autres d'au moins 140 kb, pour caractériser des souches de *R. equi*. 87 souches de *R. equi* ont été caractérisées par cet outil dont 60 d'origine équine incluant 35 isolats cliniques. 37 profils MLST ou séquences types (ST) au total ont été identifiés parmi les 87 isolats. En ce qui concerne la population de *R. equi* d'origine équine, 13 ST ont été obtenues à partir des 35 isolats cliniques et 19 ST à partir des souches environnementales, avec 4 ST communs entre les souches cliniques et les souches environnementales. Lorsque plusieurs souches provenaient du même animal, elles montraient en général le même ST mais pas toujours.

Parmi le total des 37 ST, 16 ont pu être regroupés en 6 complexes clonaux basés sur la variation d'un seul locus traduisant la présence d'une population clonale au sein de l'espèce *R. equi*. 63% des 87 souches de *R. equi* étaient incluses dans ces 6 complexes clonaux. Les souches de *R. equi* d'origine équine et possédant le plasmide de virulence (pVapA) étaient principalement associées à 4 complexes clonaux.

Les résultats de ces travaux de caractérisation réalisés avec la technique MLST montrent donc que des souches de *R. equi* virulentes (pVapA), dont des isolats cliniques, peuvent appartenir à des complexes clonaux différents et qu'un même animal peut être infecté par des souches ayant des ST distincts. Cependant, ces résultats révèlent des différences entre des souches de *R. equi* d'origine équine portant sur 7 gènes de ménage non impliqués dans la virulence.

Le génome d'une souche équine de *R. equi*, la souche 103 S, a été séquencé par le Wellcome Trust Sanger Institute dès 2010 (Letek *et al.* 2010). En 2016, Anastasi *et al.* (Anastasi *et al.* 2016) ont réalisé le séquençage complet du génome de 29 souches de *R. equi* d'origines animales et géographiques diverses dont des souches équines. Les résultats ont révélé que *R. equi* est génétiquement homogène avec un core genome important contenant 3 858 clusters de gènes homologues et représentant environ ≈ 80% du contenu génique total des isolats (81,5% du pangénome de la souche 103S).

En particulier, sont intégrés dans ce core genome :

- tous les loci supposés associés à la virulence présents dans la souche 103S, en incluant ceux identifiés comme des îlots de gènes de transfert horizontal comme *mce2*, *srt1*, *srt2* et les déterminants de la biosynthèse des pili et de la capsule,
- tous les loci de la souche 103S potentiellement impliqués dans la tolérance à la dessiccation et au stress oxydatif (favorisant la survie dans un sol sec et la transmission via un aérosol poussiéreux),
- le résistome intrinsèque identifié chez la souche 103S ( $\beta$ -lactamases, aminoglycoside phosphotransférases, systèmes d'efflux concernant plusieurs molécules ou familles de molécules).

Ces résultats suggèrent donc que, si des complexes clonaux distincts existent parmi les souches de *R. equi* d'origine équine, ils ne sont pas nécessairement associés à un pouvoir pathogène différent.

Si ces résultats ne permettent pas de sélectionner plus particulièrement une souche pVapA à inclure dans l'autovaccin selon son complexe clonal, rien ne s'oppose à inclure plusieurs souches pVapA appartenant à des complexes clonaux distincts dans l'autovaccin.

Actuellement sur le terrain, 75% des autovaccins contiennent une seule souche, 17% en contiennent deux et 8% en contiennent trois.

### 3. Processus de préparation de l'autovaccin

La préparation de l'autovaccin suit un processus dont les différentes étapes sont fixes, d'une préparation à l'autre. Ces différentes étapes suivent les Bonnes Pratiques de Préparation en matière de vérification de souche, d'inactivation, de purification et de culture.

Les autovaccins sont constitués de corps bactériens totaux inactivés au formol.

Concernant la production d'antigènes, comme pour tout autovaccin, le niveau de qualité choisi tient compte de différents paramètres, dont notamment l'attente des vétérinaires prescripteurs et le prix d'acceptabilité des autovaccins. Ainsi, les opérations de production d'antigènes se font selon un procédé constant, pour un préparateur donné, toujours au même stade de développement des bactéries. Pour autant, ce stade de développement n'est pas aujourd'hui optimisé par les préparateurs d'autovaccins sur le plan de la production antigénique. En effet, la phase de croissance en culture influe sur la composition antigénique des bactéries. Ainsi, on observe pour *R. equi*, au-delà de la phase exponentielle, la production d'une quantité plus importante de polysaccharides capsulaires (Petry & Duquesne, communication personnelle). Ce phénomène permet d'envisager une optimisation de la production d'antigènes. Des protocoles de production d'antigènes permettant d'orienter cette dernière vers un rapport antigènes capsulaires/protéines sécrétées/protéines membranaires favorable aux antigènes membranaires et sécrétés incluant les protéines VapA et VapC, dont on sait qu'ils sont déterminants pour la qualité d'un vaccin/autovaccin, pourraient être standardisés. Les préparateurs d'autovaccins pourraient s'inspirer de ces protocoles s'ils souhaitent optimiser la production d'antigènes.

Le contrôle du produit fini porte essentiellement sur la stérilité du produit. Il n'y a pas de contrôle de la teneur en antigènes, du fait :

- d'un manque de connaissance scientifique sur la quantité d'antigènes nécessaire pour induire une protection chez l'animal
- d'un manque de technique analytique permettant d'évaluer l'efficacité vaccinale (cf 3.3.1)

On notera par ailleurs qu'au cours des différentes manipulations (repiquages, congélation, etc ...), la bactérie peut perdre son plasmide de virulence. Il peut donc être pertinent de vérifier le maintien du plasmide de virulence au cours du temps.

#### 4. Adjuvants

Il ressort des auditions un consensus sur la prudence à observer vis-à-vis des adjuvants pour des autovaccins destinés aux équidés. Compte tenu d'un risque important de réaction inflammatoire locale aux adjuvants, de la part des animaux de cette espèce, les préparateurs d'autovaccins préfèrent privilégier la sécurité au gain d'efficacité que pourrait apporter un adjuvant.

Par ailleurs, les experts soulignent que certains adjuvants pourraient être contre-productifs dans le cas d'un autovaccin contre la rhodococcose, s'ils n'orientent pas la réponse immunitaire vers la voie Th1. C'est par exemple le cas de l'hydroxyde d'alumine, qui oriente la réponse immunitaire vers la voie Th2 (Lee et Nguyen 2015).

Si un vétérinaire prescripteur demandait le recours à un adjuvant, il serait préférable de recommander un test de tolérance préalable à la vaccination.

Il convient de noter qu'à partir d'une liste d'adjuvants proposée par chacun des préparateurs d'autovaccins, l'ANMV ne retient que les adjuvants pour lesquels le temps d'attente sera de 0 jour.

Ces adjuvants figurent dans une annexe jointe à chacune des autorisations de préparation d'autovaccins délivrées par l'ANMV, et chaque liste est donc spécifique à chaque préparateur d'autovaccins. Toutefois, elle ne cible pas d'espèce animale en particulier. La présence de ces adjuvants dans cette liste ne signifie donc pas qu'ils sont spécifiquement destinés au cheval.

La compilation des différentes listes d'adjuvants utilisés par les préparateurs d'autovaccins figure dans le tableau ci-dessous avec la voie immunitaire privilégiée par chaque adjuvant. Les experts soulignent que cette présentation reste très simplifiée par rapport à la réalité, elle-même beaucoup plus complexe, compte tenu des modes d'action pluriels et complexes des adjuvants. Ainsi, ce tableau n'est qu'indicatif d'une orientation immunitaire.

**Tableau 3 : adjuvants et substances entrant dans la composition d'adjuvants, autorisés pour la préparation d'autovaccins et orientation immunitaire** (Aucouturier, Dupuis, et Ganne 2001, Lee et Nguyen 2015, Pasquale *et al.* 2015, Petrovsky et Aguilar 2004, Sokolovska, Hem, et HogenEsch 2007).

Nom de l'adjuvant ou de la substance entrant dans la composition d'adjuvants	Nature	Généralités et orientation immunitaire
Alhydrogel	Hydroxyde d'aluminium	Th2, bonne réponse humorale mais faible réponse à médiation cellulaire.
Gel de phosphate de calcium	Hydroxyapatite non stoechiométrique	Th1, induit également une réponse humorale de bon niveau.
Huile de paraffine	Huile minérale	Entre dans la composition de nombreuses émulsions, tels que l'adjuvant de Freund.
Marcol 52	Huile minérale, paraffine et cycloparaffine	Entre dans la composition des émulsions eau-dans-huile <sup>1</sup> .
Montanide IMS 2215	Huile minérale	Micro-émulsion, huile-dans-eau.
Montanide ISA 25	Huile minérale	Entre dans la composition des émulsions huile-dans-eau <sup>2</sup> .
Montanide ISA 35	Huile non-minérale	
Montanide ISA 50 70	Huile minérale	Entre dans la composition des émulsions eau-dans-huile <sup>1</sup> .
Montanide ISA 763 A VG	Huile non-minérale	
Montanide ISA 773	Huile minérale et huile métabolisable	
Brij	Tensioactif non-ionique, polyéthylène oleyl/stearyl ether	Molécule hydrophile-hydrophobe non-chargée.
Myrj	Tensioactif non-ionique, stéarate de polyoxyéthylène	Molécule hydrophile-hydrophobe non-chargée. Entre dans la composition d'émulsions, seule ou associée aux polysorbate, Span et Tween.
Polysorbate 80 (Tween 80)	Tensioactif non-ionique, monooléate de polyoxyéthylène sorbitane	Molécule hydrophile-hydrophobe non-chargée. Entre dans la composition d'émulsions huile-dans-eau <sup>2</sup> , eau-dans-huile <sup>1</sup> , eau-dans-huile-dans-eau.
Span 85 Pharma	Tensioactif non-ionique, trioléate de sorbitan	Molécule hydrophile-hydrophobe non-chargée, entre dans la composition des émulsions eau-dans-huile <sup>1</sup> et autres.
Tween	Tensioactif non-ionique, polyoxyethylene-20-trioleate	
<b>Emulsions : généralités et orientation immunitaire</b>		
<sup>1</sup> Emulsion eau-dans-huile	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effet dépôt (libération lente de l'antigène au site d'administration).</li> <li>• Protection de l'antigène contre la protéolyse.</li> <li>• Inflammation et recrutement des cellules CPA.</li> <li>• Améliore la prise en charge de l'antigène (interaction tensioactif-membrane cellulaire).</li> <li>• Accumulation lymphocytaire au niveau des ganglions drainants.</li> <li>• Effet immuno-stimulateur des tensioactifs</li> <li>• Th1, bonnes réponses humorale et à médiation cellulaire.</li> <li>• Réactions inflammatoires locales fréquentes.</li> </ul>	
<sup>2</sup> Emulsion huile-dans-eau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réponse immunitaire Th2 principalement.</li> <li>• Favorise la prise en charge de l'antigène.</li> <li>• Activation indirecte des CPA.</li> <li>• Réactions inflammatoires locales réduites par rapport aux émulsions eau-dans-huile.</li> </ul>	

## 5. Protocoles d'administration

Les protocoles d'administration sont variés et dépendent des vétérinaires prescripteurs.

Il convient néanmoins de noter deux types d'autovaccination, qui ne poursuivent pas le même objectif :

- Vaccination d'individus adultes donneurs, pour ensuite prélever du plasma en vue de l'administrer aux poulains.
- Vaccination de la jument gestante, puis de la progéniture afin de prendre le relais de la protection colostrale, chez le poulain.

Ce dernier protocole, proposé par les producteurs d'autovaccins appelle un commentaire de la part des rapporteurs relatif aux interférences reconnues entre les anticorps maternels d'origine colostrale et la réponse immune propre du poulain.

Les directives actuelles en matière de vaccination des équidés recommandent que la vaccination des poulains débute entre 3 et 6 mois d'âge, selon le vaccin administré. En effet, chez le poulain plus jeune, les anticorps maternels d'origine colostrale exercent un effet inhibiteur important sur la production d'anticorps (Ryan and Giguere, 2010).

Ceci est corroboré par le fait que la production propre d'anticorps démarre plus précocement chez les poulains privés de colostrum par rapport aux poulains ayant bénéficié d'un transfert adéquat d'immunité passive (2 semaines versus 6-8 semaines) (Jeffcott, 1974).

De manière plus spécifique, les travaux de thèse de Julien Cauchard (2005) ont montré que la production d'anticorps anti-*R. equi* survient plus tôt chez les poulains issus de juments non vaccinées contre la bactérie que chez les poulains nés de juments vaccinées en fin de gestation. En effet, les titres en anticorps anti-*R. equi* chez les poulains issus de juments vaccinés sont très élevés dans les premiers jours suite à la prise colostrale, puis déclinent régulièrement jusqu'à l'âge de 100 jours, alors que les titres des poulains témoins augmentent à partir de 30 jours pour les rejoindre puis les dépasser autour de 60 jours.

La vitesse de déclin des anticorps maternels varie selon la nature de l'antigène. Pour de nombreux agents pathogènes, la concentration en anticorps maternels chez les poulains tombe à un niveau n'assurant plus de protection autour de l'âge de 2-3 mois (Ryan and Giguere, 2010). Cependant, par exemple, en ce qui concerne la grippe équine et le tétanos, les anticorps maternels chez les poulains nés de mères vaccinées dans les deux derniers mois de gestation, peuvent persister jusqu'à l'âge de 6 mois environ et préviennent une réponse immune adéquate chez les poulains qui sont vaccinés avant d'avoir atteint cet âge (Wilson et al., 2001), principalement dans le cas de vaccins à base de virus complets inactivés et/ou sous-unitaires.

En ce qui concerne les autovaccins tels que produits actuellement en France, très peu de données sont disponibles i) sur la cinétique de diminution, chez les poulains issus de juments ayant reçu l'autovaccin dans les 2-3 mois avant le poulinage, des anticorps maternels spécifiques dirigés contre les antigènes contenus dans l'autovaccin (Cauchard et al. 2004) et donc ii) sur l'âge auquel l'administration de l'autovaccin au poulain lui-même pourrait être efficace du fait d'un risque plus faible d'interférence. Ainsi, en l'état actuel des connaissances et en l'absence d'études cliniques spécifiques, il ne peut être recommandé d'immuniser le poulain avec un autovaccin si sa mère l'a été également, sauf peut-être à un âge avancé, au-delà de 3 mois, mais qui ne correspond plus à la période de sensibilité accrue à la rhodococcose.

Par ailleurs, les experts soulignent qu'il est difficile de recommander un protocole d'autovaccination spécifique, notamment chez le poulain (par exemple, nombre d'injections, délai entre chaque injection), dans le contexte de la composition des autovaccins produits en France à l'heure actuelle, et en l'absence d'études sur la cinétique des anticorps anti-VapA, en fonction des doses et modalités d'administration employées.

L'absence d'étude de ce type semble en partie liée au manque actuel de méthodes sérologiques standardisées permettant de quantifier la concentration en anticorps protecteurs, notamment en anticorps anti-VapA (cf. 3.3.2.2).

#### 6. Efficacité des autovaccins

Compte tenu du principe des autovaccins, des modalités de leur obtention et de leur utilisation uniquement en France, il n'existe que très peu de publications scientifiques relatives à leur efficacité. Si certains opérateurs ont pu effectuer des essais dans le cadre de leur activité, les résultats sont restés privés. Quelques publications traitant d'essais de vaccins complets à bactéries inactivées assimilables par leur mode de préparation à des autovaccins apportent, néanmoins, quelques informations sur leur éventuelle efficacité. Quelques expérimentations portant sur des essais de vaccination avec des suspensions de *R. equi* inactivées par le formol et associées à un adjuvant (phosphate d'alumine, par exemple dans l'étude de Varga *et al.* publiée en 1997) ou non (cas dans l'étude de Cauchard *et al.* publiée en 2004) semblent indiquer que de tels vaccins, administrés successivement ou non chez les juments avant la mise-bas et chez leur poulain après leur naissance, pourraient contribuer à réduire la prévalence de la maladie chez les poulains dans les exploitations enzootiquement affectées. En revanche, les études disponibles ne permettent pas d'évaluer la réponse sérologique à attendre en termes de titre en anticorps (anticorps dirigés contre la protéine VapA, anticorps opsonisants...) dans le sérum prélevé chez les mères vaccinées, dans leur colostrum, puis dans le sérum des poulains après leur naissance, variable voire divergente selon l'étude, du fait sans doute de la diversité des protocoles vaccinaux utilisés et des techniques sérologiques choisies pour caractériser les anticorps.

#### 3.3.5.2. Conclusions, recommandations et questions de recherche

Les autovaccins font partie des moyens envisageables pour la prévention de la rhodococcose, cependant la caractérisation actuelle des autovaccins est insuffisante pour assurer leur efficacité. Il serait nécessaire d'améliorer cette caractérisation :

- en vérifiant la présence du plasmide de virulence
- en vérifiant la présence de la protéine VapA dans la préparation antigénique

Par ailleurs, les experts soulignent l'absence actuelle d'outils de « pilotage » pour améliorer l'efficacité de ces autovaccins,

- en termes de caractérisation des souches à introduire pour la préparation des autovaccins : même si la plus-value de l'utilisation de plusieurs souches virulentes dans un autovaccin n'est pas avérée à la lumière des connaissances sur les génomes chromosomique et plasmidique de *R. equi*, il pourrait être utile de développer des outils de caractérisation de routine, directs (caractérisation moléculaire) ou indirects (caractérisation antigénique), pour mieux suivre la circulation des différents clones au sein d'un élevage.
- en termes de vérification de l'efficacité vaccinale et d'élaboration des protocoles d'administration des autovaccins : une amélioration et une standardisation des méthodes sérologiques, visant une quantification fiable des anticorps, seraient nécessaires pour permettre de suivre de façon plus fine la cinétique des anticorps produits, en fonction des doses administrées et des protocoles testés, dans le cadre d'une étude d'efficacité des autovaccins.

### 3.4. Diagnostic et prise en charge médicale

#### 3.4.1. Etat des connaissances

##### 3.4.1.1. Diagnostic de suspicion

###### 1. Signes cliniques

La rhodococcose est dans la plupart des cas à l'origine d'une pneumonie abcédative chez des poulains de 1 à 6 mois, mais de nombreuses autres localisations de l'infection ont été décrites, dont les plus fréquentes sont la cavité abdominale et les yeux (Reuss 2016).

L'examen clinique approfondi est bien sûr la première méthode à utiliser dans le cadre du diagnostic d'une infection à *R. equi*. La majorité des animaux affectés sont abattus, présentent de la fièvre et, dans les cas de pneumonie, on observe une tachypnée voire une dyspnée et de la toux (Giguère *et al.* 2011). L'auscultation pulmonaire permet de détecter d'éventuelles zones sourdes formées par les abcès, de même que des sifflements et des crépitements. Des complications de polysynovite auto-immune associée à des distensions articulaires multiples sont décrites dans 40% des cas (Reuss 2016). Dans les cas de localisations inhabituelles d'infection, les signes cliniques dépendent de l'organe concerné, et l'atteinte clinique peut se manifester par une diarrhée, un amaigrissement, des coliques, une uvéite, une boiterie, ou des signes nerveux.

Il n'existe pas d'étude épidémiologique permettant d'évaluer la sensibilité et la spécificité de l'examen clinique dans le diagnostic d'une pneumonie à *R. equi* (Cohen 2014b).

###### 2. Analyses sanguines

Les poulains atteints de rhodococcose ont des signes caractéristiques d'infection bactérienne à l'analyse sanguine : leucocytose neutrophilique, hyperfibrinogénémie, hyperglobulinémie et élévation des SAA (sérum amyloïde A). En particulier, il a été prouvé qu'un taux de globules blancs supérieur à 20000/ $\mu$ L et un taux de fibrinogène supérieur à 7g/L sont des éléments plus spécifiques d'une pneumonie à *R. equi* chez les poulains hospitalisés pour pneumonie (Leclere *et al.* 2011). Pour la détection précoce dans un élevage atteint de façon enzootique, la numération des polynucléaires neutrophiles était une meilleure méthode de détection des poulains malades que le taux de fibrinogène (Giguère, Hernandez, Gaskin, Miller, *et al.* 2003). En effet pour une limite à 13000 cellules/ $\mu$ L, la sensibilité était de 95,2% et la spécificité de 61,2%; pour une limite à 15000 cellules/ $\mu$ L, la sensibilité était de 78,6% et la spécificité de 90,8%. Ce résultat n'est pas corroboré par une autre étude (Chaffin *et al.* 2013), dans laquelle la sensibilité et la spécificité de la leucocytose à plus de 13000c/ $\mu$ L était modeste. De plus, dans le cadre d'un dépistage dans un élevage où la rhodococcose est enzootique, une leucocytose peut être provoquée par une autre infection bactérienne, ce qui est fréquent chez les poulains (Giguère *et al.* 2011).

Dans une étude (Giguère, Hernandez, Gaskin, Miller, *et al.* 2003), un taux de fibrinogène à 5g/L avait une sensibilité de 71,4% et spécificité de 68,4%. Une étude italienne a montré une différence significative dans le taux de fibrinogène plasmatique entre des poulains atteints et des poulains sains, mais le nombre de cas était faible (Passamonti *et al.* 2015).

Trois études ont évalué l'intérêt du dosage de SAA dans le cadre de la détection précoce des pneumonies à *R. equi*, et les résultats sont peu discriminants et ne permettent pas de recommander son utilisation dans ce cadre (Cohen, Chaffin, *et al.* 2005, Giguère, Berghaus, et Miller 2016, Passamonti *et al.* 2015). La sensibilité et la spécificité d'un taux de SAA > 53 $\mu$ g/mL ont été évaluées respectivement à 64 et 77% (Giguère, Berghaus, et Miller 2016). Par contre, le dosage de SAA peut s'avérer utile dans le suivi des cas traités pour décider de l'arrêt du traitement (Passamonti *et al.* 2015).

Comme indiqué au point 3.3.2.2, de nombreux auteurs ont étudié différentes méthodes sérologiques (ELISA, AGID) pour le diagnostic de rhodococcose chez le poulain et, compte tenu des résultats, la conférence de consensus tenue par l'ACVIM en 2011 (Giguère *et al.* 2011) a conclu que l'état actuel des connaissances ne permet pas de recommander les tests sérologiques dans le diagnostic des pneumonies à *R. equi*.

Seule l'étude la plus récente montre l'intérêt d'un test ELISA détectant les IgG(T) contre la protéine VapA, avec 90% de sensibilité et 96% de spécificité (Sanz *et al.* 2016). Cette méthode mérite d'être évaluée dans des conditions cliniques.

### 3. Imagerie

La détection de lésions alvéolaires de type abcédatif à la radiographie pulmonaire est également une méthode spécifique de diagnostic des pneumonies à *R. equi* chez le poulain (Leclere *et al.* 2011). La radiographie pulmonaire présente également une valeur pronostique dans le cadre des pneumonies à *R. equi* (Giguère et Roberts 2012). Mais cette technique est difficile à mettre en place en routine sur le terrain. C'est pourquoi l'échographie thoracique, bien que ne permettant pas d'évaluer la présence de lésions pulmonaires profondes, est couramment utilisée pour la détection d'abcès et/ou de densification pulmonaire superficiels (Ramirez, Lester, et Roberts 2004). Pourtant, peu de données objectives existent sur sa sensibilité et sa spécificité (Ramirez, Lester, et Roberts 2004). Dans un élevage où la rhodococcose est enzootique, l'observation d'abcès superficiels à l'échographie thoracique est fortement évocatrice d'une pneumonie à *R. equi*. Cette méthode, couramment utilisée dans le cadre du dépistage systématique à partir de 30 jours dans les élevages où la rhodococcose est enzootique a toutefois conduit à la détection et au traitement de nombreux cas de pneumonies subcliniques auto-limitantes, et donc à une surutilisation d'antibiotiques (Slovis, McCracken, et Mundy 2005, Venner *et al.* 2012).

#### 3.4.1.2. Diagnostic de certitude

Seule la mise en évidence de *R. equi* par PCR (recherche du gène codant pour VapA) ou par culture bactériologique permet un diagnostic de certitude d'infection. Dans le cas d'une forme respiratoire d'infection à *R. equi*, l'aspiration transtrachéale est la méthode recommandée. La PCR ne peut pas remplacer complètement la bactériologie car elle ne permet pas de mettre en évidence des infections concomitantes par d'autres bactéries (Giguère *et al.* 2011). L'écouvillon nasopharyngé n'est pas un prélèvement adéquat pour le diagnostic des pneumonies à *R. equi* (Hashikura *et al.* 2000, Pusterla *et al.* 2007). La détection de *R. equi* dans les fèces a également montré une mauvaise sensibilité et spécificité dans le cadre d'une infection à *R. equi* (Giguère *et al.* 2011).

Dans le cadre d'une infection extrapulmonaire, la détection de la bactérie se fera préférentiellement au site d'infection, mais peut également se faire par défaut par aspiration transtrachéale. Cependant un résultat négatif ne permet pas d'exclure une localisation extrapulmonaire isolée. Le diagnostic de certitude d'une entérocologie à *R. equi* reste problématique car la détection de la bactérie dans les fèces ne peut pas être considérée comme une méthode fiable (Giguère *et al.* 2011). En effet, de nombreux porteurs asymptomatiques existent.

Au bilan, dans les élevages où la maladie est enzootique, le protocole de dépistage suivant peut être proposé (Cohen, Chaffin, et Martens 2000, Giguère 2001, Giguère et Prescott 1997).

- Un contrôle quotidien du comportement, de la température et du rythme respiratoire (poulain au repos),
- Un examen physique complet toutes les 2 semaines effectué par un vétérinaire et incluant une auscultation thoracique soigneuse,

- La réalisation d'une numération/formule sanguine et un dosage de la fibrinogénémie toutes les 2 semaines,
- La réalisation d'un examen échographique du thorax toutes les 2 semaines.

L'approche optimale varie probablement d'un élevage à l'autre en fonction de la prévalence de la maladie, des ressources humaines et financières disponibles, des pratiques d'élevage et des préférences techniques du vétérinaire traitant (Giguère *et al.* 2011).

#### 3.4.1.3. Efficacité des antibiotiques contre *Rhodococcus equi*

*R. equi* est une bactérie intracellulaire facultative, capable de survivre et de se répliquer à l'intérieur des macrophages, et nécessite l'utilisation d'antibiotiques à bonne pénétration intracellulaire pour la détruire. Pour cette raison, il n'est pas possible d'établir un lien direct entre l'efficacité des antibiotiques *in vitro* et leurs effets attendus *in vivo*.

##### 1. Etudes in vitro

*In vitro*, de nombreux antibiotiques sont actifs contre *R. equi*, si l'on se fie à leur CMI (concentration minimale inhibitrice). Parmi eux, de nombreux macrolides, aminoglycosides, la rifampicine, l'imipenem, la doxycycline, l'enrofloxacin (Giguère *et al.* 2012). Il est à noter que les macrolides et la rifampicine n'ont qu'un effet bactériostatique, contrairement aux aminoglycosides et à l'enrofloxacin. D'autre part, les macrolides n'ont pas tous la même efficacité contre *R. equi* et la tilmicosine, la tulathromycine, la tilosine sont considérées comme peu actives *in vitro*. Enfin, alors que certaines combinaisons ont des effets synergiques tels que les macrolides et la rifampicine, la doxycycline et la rifampicine, la doxycycline et les macrolides, d'autres ont des effets antagonistes, tels que l'amikacine et les macrolides, l'amikacine et la rifampicine, la gentamicine et la rifampicine (Prescott et Nicholson 1984).

##### ✓ Etudes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

Etant donné que la plupart des antibiotiques utilisés pour traiter la pneumonie à *R. equi* chez le poulain ont un large volume de distribution, leur concentration sanguine ne permet pas de préjuger de leur efficacité *in vivo* dans les tissus pulmonaires des animaux atteints. C'est pourquoi, les études pharmacologiques les plus récentes utilisent la concentration dans le fluide de surface épithéliale pulmonaire (« pulmonary epithelial lining fluid »), et dans les cellules obtenues par lavage broncho-alvéolaire (LBA), comme cela est fait en médecine humaine (Giguère 2017).

##### • MACROLIDES ET RIFAMPICINE

- La biodisponibilité par voie orale de l'érythromycine est faible, d'autant plus si le poulain n'est pas à jeun (Lakritz *et al.* 2000). La clarythromycine et l'azithromycine présentent l'avantage d'une meilleure biodisponibilité par voie orale, même après alimentation, d'une demi-vie prolongée, et d'une concentration nettement supérieure dans le liquide de surface épithéliale pulmonaire et les cellules de lavage broncho-alvéolaire. La clarythromycine offre une concentration bien plus élevée dans ces 2 éléments, mais la demi-vie de l'azithromycine est nettement supérieure et sa concentration dans les poumons est maintenue pendant plusieurs jours après l'arrêt du traitement (Davis *et al.* 2002, Suarez-Mier, Giguère, et Lee 2007).
- D'autres macrolides, à action prolongée, ont été étudiés chez le poulain. La tilmicosine et la tulathromycine, utilisées aux doses recommandées par voie IM, présentent une concentration insuffisante dans les cellules du LBA, inférieure à

la CMI pour *R. equi* (Scheuch *et al.* 2007, Womble *et al.* 2006). Par contre, une injection IM de gamithromycine permet d'atteindre une concentration suffisante dans les cellules du LBA pendant 7 jours (Berghaus *et al.* 2012).

- Rifampicine : La biodisponibilité de la rifampicine par voie orale est de 49% chez l'adulte et semble meilleure chez le poulain. Cette molécule se concentre moins dans les fluides de surface épithéliale pulmonaire et les cellules du LBA que dans le sang, mais la concentration obtenue reste largement au-dessus de la CMI pour *R. equi* (Burrows *et al.* 1992, Kohn *et al.* 1993).

D'autre part, des études récentes ont montré que l'administration de rifampicine diminuait considérablement la biodisponibilité de la clarythromycine par inhibition de transporteurs intestinaux. Cependant, les concentrations en clarythromycine dans les tissus et liquides pulmonaires restaient largement au-dessus des CMI pour *R. equi* (Peters *et al.* 2011, Peters *et al.* 2012). L'administration de la rifampicine 4h après la clarythromycine permettait d'améliorer significativement la biodisponibilité de cette dernière, mais sans que cela puisse avoir pour autant une importance clinique (Berlin *et al.* 2016).

- AUTRES ANTIBIOTIQUES

La doxycycline par voie orale à dosage usuel présente des concentrations dans les fluides de surface épithéliale et dans les cellules du LBA au-dessus de la CMI (Womble, Giguere, et Lee 2007). Il en est de même pour la gentamicine utilisée IV ou en nébulisation. L'encapsulation de la gentamicine dans des liposomes a induit une concentration plus élevée que celle de la gentamicine libre dans les cellules du LBA que ce soit par voie parentérale ou en nébulisation (Burton, Giguère, Berghaus, Hondalus, *et al.* 2015).

## 2. Etudes d'efficacité in vivo

Dans les études expérimentales réalisées chez la souris, la combinaison macrolide/rifampicine s'est avérée la thérapie la plus efficace pour lutter contre l'infection à *R. equi* (Burton, Giguère, Berghaus, et Hondalus 2015, Nordmann, Kerestedjian, et Ronco 1992).

L'infection expérimentale des poulains est difficile à réaliser et ne reflète pas l'infection naturelle (Giguère 2017). La plupart des données sur l'efficacité des différents antibiotiques sont donc issues d'études rétrospectives. Dans ce cadre-là aussi, la combinaison macrolides/rifampicine s'avère la plus efficace, avec un taux de survie entre 69 et 82% pour les cas de pneumonies les plus sévères, et entre 87 et 97% pour des cas plus légers (Giguère 2017). L'érythromycine était le macrolide utilisé dans les années 1980 (Sweeney, Sweeney, et Divers 1987), mais a été remplacé par la clarythromycine et l'azithromycine qui présentent une meilleure efficacité (Giguère *et al.* 2004).

Plusieurs études en aveugle avec un groupe témoin ont été réalisées dans une ferme où la maladie sévissait de façon enzootique, par l'équipe de Venner. La plupart de ces études ont été réalisées sur des poulains atteints de forme subclinique de pneumonie abcédative, détectée par échographie thoracique. Ces études ont montré que pour des lésions d'étendue légère à modérée, les traitements n'offraient pas un taux de guérison plus élevé que le placebo (Venner, Astheimer, *et al.* 2013, Venner *et al.* 2012). Dans les cas d'atteinte plus sévère, l'azithromycine avec ou sans rifampicine et la gamythromycine offraient un meilleur taux de guérison que le placebo, ce qui n'était pas le cas de la tulathromycine (Hildebrand, Venner, et Giguère 2015, Venner, Credner, *et al.* 2013).

#### 3.4.1.4. Mise en évidence de résistances et lutte contre celles-ci

Les premiers isolats de *R. equi* résistant à la rifampicine et/ou à l'érythromycine ont été décrits dans les années 90 en Amérique du Nord et au Japon (Kenney *et al.* 1994, Takai *et al.* 1997) et une mutation spécifique sur le gène *rob* a été identifiée en 2001 en France (Fines *et al.* 2001)(Fines *et al.*, 2001). Ceci a conduit à une étude plus large menée par 9 laboratoires sur des isolats de *R. equi* résistants aux Etats Unis entre 1997 et 2008. 24 isolats ont été considérés comme résistants à la rifampicine et/ou un macrolide. Parmi eux, la plupart (22/24) étaient résistants à la fois à la rifampicine et aux 3 macrolides les plus utilisés dans le traitement de la rhodococcose, soit l'érythromycine, l'azithromycine, et la clarythromycine. La prévalence de la résistance parmi les souches était variable en fonction des laboratoires, mais atteignait jusqu'à 4% dans certains d'entre eux (Giguère *et al.* 2010). En France, le taux de résistance à l'érythromycine et à la rifampicine des souches de *R. equi* cultivées au laboratoire Labéo Frank Duncombe est variable depuis 2006, mais ne semble pas en augmentation (Léon, 2017 communication personnelle). Une étude menée dans une ferme américaine, où de nombreux poulains atteints de forme subclinique étaient traités chaque année, a montré la présence de 24% d'isolats résistants dans une population de poulains avant traitement (Burton *et al.* 2013). Une des pistes pour limiter l'apparition de résistances serait donc de limiter le traitement aux animaux atteints cliniquement.

Une étude récente (Berghaus, Giguère, et Guldbech 2013) a analysé la fenêtre de sélection des mutants, entre la CMI et la concentration de prévention des mutants (CPM) des différents antibiotiques utilisés pour le traitement de *R. equi* chez le poulain. Parmi les 10 antibiotiques étudiés, la rifampicine était celui qui avait la CPM la plus élevée, indiquant que la monothérapie à la rifampicine était susceptible d'induire des résistances. Par contre, la combinaison avec l'un des 3 macrolides fréquemment utilisés faisait chuter nettement la CPM, et donc le risque de développement de mutants résistants, au moins *in vitro*.

#### 3.4.1.5. Effets secondaires des antibiotiques

Les macrolides utilisés par voie orale chez le poulain sont une cause fréquente de diarrhée. Celle-ci est dans la majorité des cas auto-limitante et ne nécessite pas toujours l'arrêt du traitement. Toutefois, certains poulains peuvent développer une déshydratation et des déséquilibres électrolytiques qui nécessitent des soins importants et l'arrêt du traitement. Deux études rétrospectives ont évalué le risque de diarrhée chez les poulains traités à l'érythromycine. Dans l'étude de (Stratton-Phelps, Wilson, et Gardner 2000), 36% des poulains traités à l'érythromycine développaient de la diarrhée, ce qui représentait un risque 8 fois plus élevé que pour les poulains traités avec d'autres antibiotiques. Dans l'étude de (Giguère *et al.* 2004), 17% ont développé de la diarrhée. Cette étude rapporte également de la diarrhée chez 28% des poulains traités à la clarythromycine et chez 8% des poulains traités à l'azithromycine.

Les macrolides, principalement l'érythromycine, sont également susceptibles de déclencher des diarrhées sévères chez les mères des poulains traités (Båverud *et al.* 1998). La cause suspectée de ces diarrhées dans lesquelles *Clostridium difficile* a été impliqué, est une dysbactériose digestive secondaire à l'ingestion de petites quantités d'antibiotiques. Celle-ci pourrait se faire par coprophagie et/ou léchage des abreuvoirs ou des mangeoires souillés par la bouche du poulain juste après la prise médicamenteuse. Cette complication est rare, mais souvent mortelle et a pu être reproduite expérimentalement par administration de doses sub-thérapeutiques d'érythromycine (Gustafsson *et al.* 1997).

Un autre effet secondaire décrit suite à l'utilisation de macrolides chez les poulains, est le développement d'une anhidrose (Stieler *et al.* 2016, Stratton-Phelps, Wilson, et Gardner 2000). L'anhidrose est plus sévère chez les poulains traités à l'érythromycine, mais peut être présente également chez les poulains traités à la clarythromycine et l'azithromycine (Stieler Stewart *et al.* 2017), et peut être à l'origine d'une hyperthermie sévère et d'une tachypnée quand le poulain est dans un environnement chaud.

L'enrofloxacin, bien qu'efficace et bactéricide, n'est pas utilisé dans le cadre du traitement de la pneumonie à *R. equi* chez le poulain car elle présente une toxicité cartilagineuse qui pourrait être à l'origine d'arthropathies chez le poulain (Vivrette *et al.* 2001).

De même, la combinaison doxycycline rifampicine, qui semble synergique *in vitro* a déclenché des effets secondaires graves d'anémie hémolytique dans une étude clinique (Venner, Astheimer, *et al.* 2013)

Enfin, la gamithromycine, qui a fourni des résultats intéressants lors des premières études cliniques, est peu utilisée du fait de réactions locales importantes au point d'injection (Hildebrand, Venner, et Giguère 2015).

#### **3.4.1.6. Autres voies de traitements en cours d'étude ou à étudier**

Outre les macrolides disponibles plus récemment comme la gamithromycine pour laquelle on commence à avoir des données intéressantes sur son efficacité *in vitro* (Berghaus *et al.* 2012, Berlin *et al.* 2017) et sur des cas cliniques (Hildebrand, Venner, et Giguère 2015), mais qui présente des effets indésirables par voie intramusculaire, une autre voie de traitement est en cours d'exploration : la gentamicine liposomale, qui a été étudiée sur la souris (Burton, Giguère, Berghaus, Hondalus, *et al.* 2015) et chez le poulain sain (Burton, Giguère, et Arnold 2015), ainsi que sur quelques cas cliniques (Cohen *et al.* 2016). Cette molécule semble prometteuse mais de plus amples études seraient nécessaires. D'autre part, lors de l'étude sur 5 cas cliniques (Cohen *et al.* 2016), plusieurs animaux ont montré des signes de néphrotoxicité, ce qui nécessiterait de réadapter le dosage et/ou la voie d'administration avant de pouvoir recommander cet antibiotique.

Le maltolate de gallium est un produit semi-métallique qui a une activité antibactérienne *in vitro* sur *R. equi* et une étude pharmacocinétique a montré qu'il pouvait être utilisé dans le cadre du traitement de la rhodococcose chez le poulain (Martens *et al.* 2010, Martens *et al.* 2007). La seule étude clinique réalisée à ce jour ne permet pourtant pas de tirer de conclusion claire sur son efficacité (Cohen *et al.* 2015).

#### **3.4.1.7. Statut réglementaire des principaux antibiotiques cités**

Le tableau 4 ci-dessous précise le statut réglementaire des différents antibiotiques utilisés dans le traitement de la rhodococcose.

**Tableau 4 : Principaux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à *R. equi* chez le poulain, dosages recommandés, disponibilité et conditions d'utilisation.**

Antibiotique	Dosage	Disponibilité en France	Antibiotique critique
Erythromycine	25mg/kg TID ou QID PO	Médicament vétérinaire disponible Pas d'AMM Equine. A utiliser dans le cadre de la cascade.	Non
Azithromycine	10mg/kg SID PO	Pas de médicament vétérinaire disponible. Médicament pour H inscrit sur la liste des substances essentielles. Indication pour le traitement de la rhodococcose	Non
Clarythromycine	7,5mg/kg BID PO	Pas de médicament vétérinaire disponible. Médicaments pour H. A utiliser dans le cadre de la cascade chez les animaux exclus de la consommation	Non
Rifampicine	5-10mg/kg BID PO 10mg/kg SID PO	Pas de médicament vétérinaire disponible. Médicaments pour H inscrit sur la liste des substances essentielles. Indication pour le traitement de la rhodococcose	Antibiotique d'importance critique non autorisé (Arrêté du 18 mars 2016, art2)*
Gamithromycine	6mg/kg tous les 7 jours IM	Médicament vétérinaire Pas d'AMM Equine. A utiliser dans le cadre de la cascade.	Non
Tulathromycine	2,5mg/kg tous les 7 jours IM	Médicament vétérinaire Pas d'AMM équine. A utiliser dans le cadre de la cascade.	Non

La rifampicine est un antibiotique cité dans l'arrêté du 18 mars 2016<sup>4</sup>. Elle fait partie des substances antibiotiques d'importance critique visées par l'article R. 5141-117-3.-I<sup>5</sup>, non contenues dans un médicament vétérinaire, dont la prescription en médecine vétérinaire équine n'est autorisée que si elles figurent dans la liste des substances essentielles pour les équidés et pour une des indications prévues par le règlement (CE) n° 1950/2006. Or celui-ci, de même que le

<sup>4</sup> Arrêté du 18 mars 2016 fixant la liste des substances antibiotiques d'importance critique prévue à l'article L. 5144-1-1 du code de la santé publique et fixant la liste des méthodes de réalisation du test de détermination de la sensibilité des souches bactériennes prévue à l'article R. 5141-117-2 JORF n°0072 du 25 mars 2016.

<sup>5</sup> Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique.

règlement (UE) n° 122/2013<sup>6</sup> qui le modifie, cite la rifampicine dans la liste des substances essentielles pour les équidés pour l'indication du traitement de l'infection à *Rhodococcus equi*.

De ce fait, l'utilisation de la rifampicine est subordonnée par l'article R. 5141-117-2.-I. du code de la santé publique à :

- un examen clinique préalable (et une analyse du contexte épidémiologique) ;
- la réalisation préalable d'un examen complémentaire, visant à identifier la souche bactérienne qui pourra être, dans le cadre de la rhodococcose, la mise en culture d'un liquide de lavage trachéal, ou de tout autre prélèvement en fonction du site d'infection.
- la réalisation préalable d'un antibiogramme.

Trois dérogations sont à intégrer dans le cadre du traitement de la rhodococcose:

- la réalisation d'examens complémentaires est requise sous réserve que l'état général du ou des animaux permet le prélèvement d'un échantillon ;
- le médicament contenant l'antibiotique critique peut être prescrit avant connaissance des résultats des examens complémentaires lorsqu'il s'agit d'un cas aigu d'infection bactérienne pour laquelle un traitement avec d'autres familles d'antibiotiques serait insuffisamment efficace, ce qui est le cas de l'infection à *Rhodococcus equi*, et ce pendant 4 jours, avant de réévaluer le contexte clinique et épidémiologique et les résultats des examens complémentaires portés à la connaissance du vétérinaire ;
- le vétérinaire n'est pas tenu de réaliser ces examens complémentaires si les résultats d'examens complémentaires effectués depuis moins de trois mois pour le même animal ou des animaux du même stade physiologique présents sur le même site et pour la même affection ont été portés à sa connaissance.

### **3.4.2. Réponses aux questions**

#### **3.4.2.1. Quelle est la méthode diagnostique la plus fiable ?**

Les meilleures méthodes de détection d'une pneumonie abcédative sont la radiographie thoracique, qui est difficile à réaliser en pratique, l'échographie thoracique ainsi que la réalisation d'une numération et d'une formule sanguines et d'un dosage du fibrinogène sanguin.

La seule méthode diagnostique de certitude reconnue est la détection de *R. equi* par PCR ou culture bactériologique dans le liquide de lavage trachéal. On peut également utiliser d'autres liquides biologiques dans les cas d'infections d'autres organes, comme le liquide synovial ou le liquide péritonéal. Toutefois, il faut rappeler que la recherche de la bactérie par PCR ou par culture dans un écouvillon nasopharyngé ou un prélèvement fécal n'est ni sensible, ni spécifique pour le diagnostic d'une infection à *Rhodococcus equi*.

#### **3.4.2.2. Quels animaux traiter ?**

Sur un cas isolé de pneumonie, un diagnostic de certitude d'infection à *Rhodococcus equi* doit être réalisé avant la mise en place d'un traitement antibiotique spécifique. Ce diagnostic de certitude doit se faire par isolement de la bactérie ou recherche par PCR sur un liquide de lavage trachéal. Il est à noter que ce diagnostic de certitude est une condition obligatoire à la prescription de rifampicine, d'après la réglementation sur les antibiotiques critiques.

---

<sup>6</sup> Règlement (UE) n° 122/2013 de la Commission du 12 février 2013 modifiant le règlement (CE) n°1950/2006 établissant, conformément à la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires, une liste de substances essentielles pour le traitement des équidés.

Dans un élevage où des infections à *R. equi* ont déjà été confirmées, il est recommandé de réaliser une surveillance rapprochée des poulains de 1 à 3 mois : surveillance quotidienne de la courbe respiratoire, de la présence de toux et prise de température, évaluation vétérinaire régulière avec prise de sang pour la réalisation d'une numération/formule et dosage du fibrinogène et échographie thoracique, soit systématiques, soit en cas de détection de fièvre ou de signes respiratoires. Aucun protocole de dépistage précis n'est recommandé (Giguère *et al.* 2011). Il n'existe aucune preuve scientifique de l'intérêt de ce type de dépistage pour la réduction de la morbidité et la mortalité, même si une amélioration a été observée dans des élevages qui l'ont mis en place (Slovic, McCracken, et Mundy 2005). L'approche optimale varie probablement d'un élevage à l'autre en fonction de la prévalence de la maladie, des ressources humaines et financières disponibles, des pratiques d'élevage et des préférences techniques du vétérinaire traitant (Giguère *et al.* 2011).

Les poulains qui doivent être mis sous traitement sont les poulains qui présentent des signes cliniques compatibles avec une pneumonie à *R. equi*, associés à des images de lésions abcédatives à l'échographie thoracique et/ou à une prise de sang fournissant des informations évocatrices de la maladie (élévation marquée du taux de globules blancs, de polynucléaires neutrophiles ou de fibrinogène. un seuil de 15000 cellules/ $\mu$ L et de 5g/L étant recommandé, respectivement pour les neutrophiles et le fibrinogène, compte tenu des données issues de la littérature). Dans le cas d'un dépistage systématique, il n'est pas recommandé de traiter tous les poulains présentant des lésions échographiques ou des résultats hématologiques anormaux. Ces poulains devront être mis sous surveillance rapprochée et contrôlés toutes les semaines pour vérifier l'absence d'aggravation des images échographiques et des paramètres sanguins d'intérêt. Un traitement ne sera mis en place qu'en cas de dégradation de ces éléments.

Il est à rappeler que même dans les élevages atteints de façon enzootique, un diagnostic de certitude d'infection à *R. equi* est demandé par le législateur sur au moins un des poulains dans ces élevages dans les 3 mois précédents, afin de pouvoir prescrire de la rifampicine.

#### **3.4.2.3. Quelle est la durée de traitement ?**

Il existe très peu de données sur la durée de traitement nécessaire. Dans certaines études cliniques, les durées de traitement sont rapportées et varient de 38 à 122 jours (Hildebrand, Venner, et Giguère 2015, Venner, Astheimer, *et al.* 2013). Il est usuel de préconiser un traitement minimal de 2 semaines et il n'est pas rare que des poulains soient traités 6 semaines ou plus. Il est recommandé de réévaluer au minimum toutes les 2 semaines les signes cliniques, l'échographie thoracique et la numération/formule sanguine et la fibrinogénémie et de décider de l'arrêt du traitement dès que les anomalies sont résolues.

#### **3.4.2.4. Comment améliorer les modalités de traitement ?**

Pour l'instant, il n'existe pas d'alternative à la combinaison macrolide/rifampicine. Des études pharmacocinétiques récentes ont montré qu'une administration de la rifampicine à 10mg/kg PO une fois par jour serait acceptable (Berlin *et al.* 2017), mais aucune étude clinique d'efficacité n'existe à ce dosage. Si ceci est confirmé, la combinaison avec un macrolide qui s'administre une fois par jour comme l'azithromycine, ou une fois par semaine comme la gamithromycine permettrait d'alléger les temps et les coûts des traitements.

#### **3.4.2.5. Quelles sont les taux de résistance à la rifampicine ?**

Il existe des résistances à la rifampicine en France (Fines *et al.* 2001)(Fines et al, 2001). Elles sont souvent associées à des résistances aux macrolides (Burton *et al.* 2013, Giguère *et al.* 2010). Certaines pratiques de traitement « prophylactique » (antibioprévention par administration systématique d'antibiotiques pendant 1 semaine à un âge donné), ou de traitement trop

systématique de cas subcliniques ont été mises en cause aux Etats Unis dans le développement de telles résistances.

#### **3.4.2.6. Quelles alternatives aux traitements actuels ?**

La gentamicine liposomale pourrait être une alternative mais la néphrotoxicité observée sur la première étude clinique n'en fait pas une molécule intéressante dans l'état actuel des choses.

Le maltolate de gallium pourrait être utilisé sur les cas subcliniques pour limiter le recours aux antibiotiques dans les élevages où l'infection est enzootique.

#### **3.4.3. Axes de recherche proposés**

- recherche de méthodes diagnostiques moins invasives mais discriminantes (sérologies)
- études d'efficacité clinique sur la gamithromycine IV, sur la rifampicine administrée une fois par jour
- études complémentaires sur la gentamicine liposomale et ses effets néphrotoxiques
- études complémentaires sur le maltolate de gallium et son efficacité clinique
- études cliniques sur la durée nécessaire de traitement

### **3.5. Dispositions réglementaires**

#### **3.5.1. Vaccins**

La mise en œuvre de la « cascade » prévue à l'article L. 5143-4 du Code de la santé publique (CSP) donne priorité aux vaccins disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France, en accord avec les exigences techniques et scientifiques telles que décrites dans la Directive 2009/9/EC. A l'heure actuelle, il n'y a pas de vaccin contre la rhodococcose équine disposant d'une telle autorisation en France.

S'il existait un vaccin avec AMM contre la rhodococcose équine dans au moins un Etat membre de l'Union Européenne (UE) ou dans l'Espace Economique Européen (EEE), il pourrait être importé conformément aux articles L. 5142-7, R. 5141-123 à R. 5141-123-5 du CSP. Selon la cascade, l'importation d'un tel vaccin aurait priorité par rapport à la préparation d'un autovaccin. A l'heure actuelle, il n'y a pas non plus de vaccin contre la rhodococcose équine disposant d'une telle autorisation.

#### **3.5.2. Plasmas hyperimmuns**

Les plasmas hyper-immuns contre la rhodococcose répondent également à la définition d'un médicament vétérinaire (articles L. 5111-1 et L. 5141-1 du CSP) : en effet, dès lors que des animaux sont vaccinés de façon répétée en vue de provoquer une production massive d'anticorps anti-*R. equi* (devenant de ce fait des animaux donneurs de plasma hyper-immun), et qu'après récolte, le plasma qui contient ces anticorps est utilisé pour traiter d'autres animaux, y compris au sein d'un même élevage, il s'agit d'une production de médicament vétérinaire.

Une telle production est soumise à des obligations réglementaires, notamment en ce qui concerne :

- l'utilisation d'animaux donneurs entrant dans le cadre de la production du médicament, qui relève de l'article R.214-105 du Code rural et de la pêche maritime (CRPM), section 6 - "utilisation d'animaux vivants à des fins scientifiques" du chapitre IV – "protection des animaux",

- les conditions d'hébergement et d'entretien de ces animaux (article R. 214-95 du CRPM),
- les établissements qui détiennent et utilisent de tels animaux donneurs, qui doivent être agréés (articles R. 214-99 et R. 214-100 du CSP) et inspectés (article R. 214-104 du CRPM),
- les exigences relatives au personnel de ces établissements assurant les soins aux animaux (articles R. 214-101 et R. 214-102 du CRPM), et au personnel réalisant des procédures expérimentales sur les animaux (articles R. 214-114 et R. 214-115 du CRPM)
- les modalités relatives aux autorisations des procédures, qui doivent faire l'objet d'un avis d'un comité d'éthique (R. 214-117 CRPM),
- les modalités de traitement du plasma hyperimmun, qui doit être traité dans un établissement pharmaceutique autorisé garant de sa qualité et de son innocuité (régie notamment en France par les articles L. 5142-2, R. 5142-5 et R. 5142-8 du CSP et l'arrêté du 20/04/2012 relatif aux autorisations d'ouverture et aux modifications des autorisations d'ouverture des établissements pharmaceutiques vétérinaires),
- de la qualité du plasma, qui constitue la matière première du médicament, et doit à ce titre respecter les exigences techniques et scientifiques telles que décrites dans la Directive 2009/9/EC.

A l'heure actuelle, il n'y a pas non plus de plasma hyperimmun contre la rhodococcose équine bénéficiant d'une AMM française ou communautaire. De la même manière que pour les vaccins, un plasma hyper-immun avec AMM contre la rhodococcose équine dans au moins un Etat membre de l'UE ou dans l'EEE pourrait être importé. A la connaissance des experts, il n'y a qu'un seul plasma hyper-immun contre la rhodococcose équine disposant d'une telle autorisation, à savoir HYPERIMMUNE-RE, autorisé au Royaume Uni.

Il serait également envisageable d'autoriser l'importation des plasmas HYPERMUNE (autorisé au Royaume-Uni) et PlasmaLife (autorisé en Italie), qui ne sont pas hyperimmuns, même si la dénomination 'HYPERMUNE' pourrait le laisser penser), dont l'indication consiste en une augmentation du taux d'anticorps IgG, mais sans indication spécifique relative à la Rhodococcose.

A défaut, il est rappelé que le recours au dispositif d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) pourrait permettre aux vétérinaires praticiens d'accéder, sous certaines conditions et avec l'accord de l'ANMV, à des vaccins ou des plasmas hyperimmuns vétérinaires ne disposant pas d'autorisation dans l'UE ou l'EEE.

Enfin, il convient de noter que :

- la production de plasma hyperimmun par des personnes non autorisées au titre de la réglementation sur la pharmacie vétérinaire est une activité illégale, et relève en plus de l'exercice illégal de la médecine vétérinaire s'il s'agit de personnes non vétérinaires.
- La cession d'un médicament vétérinaire (même à titre gratuit) ne peut être réalisée que par un établissement autorisé à réaliser des opérations d'exploitation ou de vente en gros.
- S'agissant de médicaments vétérinaires immunologiques utilisés dans le cadre de la cascade, une prescription vétérinaire est obligatoire (article L. 5143-5 du CSP) pour la délivrance et l'utilisation du plasma hyperimmun contre la rhodococcose équine.

### **3.5.3. Autovaccins**

Dans la mesure où il n'existe pas de médicament autorisé contre la rhodococcose, la « cascade » prévoit l'utilisation d'autovaccins en dernier recours, conformément au 4<sup>ème</sup> alinéa qui stipule qu'« ... à défaut des médicaments mentionnés aux 1°, 2° et 3°, une préparation magistrale vétérinaire... », l'autovaccin étant une préparation magistrale vétérinaire.

De telles autorisations ont d'ores et déjà été délivrées par l'ANMV à des préparateurs d'autovaccins en France, conformément aux articles L. 5141-12, L. 5143-4, R. 5141-129 à R. 5141-141 du CSP.

### 3.6. Conclusions et recommandations

La rhodococcose est une maladie infectieuse causée par la bactérie *Rhodococcus equi*, spécifiquement par des souches hébergeant un plasmide de virulence contenant le gène VapA, exprimé à la surface de la bactérie. La maladie affecte essentiellement le poulain âgé de 3 semaines à 6 mois, chez lequel la forme la plus fréquente est une bronchopneumonie, d'évolution subaiguë ou chronique, caractérisée par le développement d'abcès pulmonaires. Il s'agit d'une maladie insidieuse, dont les signes cliniques se manifestent alors que les lésions pulmonaires sont déjà bien développées. Elle est présente dans toutes les régions de France.

*R. equi* a la particularité d'être une bactérie ubiquiste à la fois saprophyte du sol et pathogène opportuniste multi-hôtes, chez lesquels elle se comporte en parasite intracellulaire facultatif. Cette localisation intracellulaire a de nombreuses conséquences sur la détermination des moyens de prévention et de lutte contre la maladie.

#### 3.6.1. Mesures de prévention sanitaire

L'épidémiologie de la rhodococcose est assez bien décrite dans la bibliographie scientifique. Si les poulains sont infectés par l'inhalation de souches de *R. equi*, portées par les poussières dans l'air, l'existence d'un cycle sol-animal joue un rôle important dans l'épidémiologie, en faisant intervenir le tractus digestif des animaux porteurs, qui contribuent par leurs fèces et les fumiers contaminés, à la diffusion de l'infection.

L'exposition du poulain dans les jours (ou semaines) suivant sa naissance à des bactéries virulentes aérosolisées en quantité importante à partir de l'environnement (locaux, paddocks, herbages) est importante dans le développement de la maladie. Mais même si de nombreux facteurs de risque ont été identifiés pour expliquer l'atteinte enzootique particulière de certaines exploitations, les mesures de prévention sanitaires recommandées dans les élevages restent encore théoriques et les experts soulignent que des études complémentaires seraient nécessaires pour mieux caractériser les différentes pratiques, recenser les mesures réellement appliquées dans les élevages et valider sur le terrain, dans les zones les plus touchées, les mesures de gestion sanitaire les mieux adaptées et les plus efficaces. En particulier, des études épidémiologiques pourraient être conduites pour mesurer de façon intégrée l'effet des pratiques de pâturage des mères suitées (par exemple, rotations, chargement, élimination des crottins et enherbement des paddocks ...) sur le risque de pneumonie chez les poulains. En effet, ces choix de gestion peuvent influencer la quantité d'agent pathogène auquel les poulains sont exposés, mais aussi influencer la réponse immunitaire contre les souches présentes dans leur environnement, dans la période critique de baisse de l'immunité colostrale.

Pour autant, la maladie n'affecte pas tous les poulains de la même manière et les conditions de développement de la rhodococcose du poulain, en rapport avec la physiopathologie de la maladie, notamment le développement de l'immunité contre *R. equi* chez le poulain, sont particulièrement complexes et loin d'être toutes élucidées.

L'immunité contre *R. equi* est essentiellement en lien avec le caractère intracellulaire de la bactérie. Si la réponse immunitaire humorale cible les phases précoces de l'infection (anticorps anti VapA notamment), la réponse immunitaire à médiation cellulaire devient essentielle pour éliminer *R. equi* durant la phase intracellulaire, quand la réponse humorale n'a pas permis une neutralisation complète du pathogène (réponse immunitaire orientée vers la voie Th1, l'IFN $\gamma$  jouant un rôle majeur dans la stimulation, l'orientation et l'établissement de cette réponse immunitaire).

### 3.6.2. Plasma hyperimmun

Le niveau de connaissance actuel concernant la réponse immunitaire humorale du poulain et du cheval adulte laisse demeurer un certain nombre d'incertitudes, rendant difficile d'émettre des recommandations fermes en matière d'obtention et d'utilisation de plasma hyperimmun efficace contre la rhodococcose.

L'efficacité des plasmas hyperimmuns (PHI) dans la lutte contre la rhodococcose dépend de leur composition en anticorps anti *R. equi*, en particulier en termes de concentration en anticorps anti-VapA et anti-VapC et de profil isotypique des IgG anti-VapA. Il existe néanmoins encore beaucoup d'inconnues sur la connaissance fine des autres facteurs sanguins du PHI, intervenant également dans la défense contre la rhodococcose.

Par ailleurs, les méthodes de contrôle de la qualité des PHI font encore l'objet de discussion, car les techniques de mise en évidence des anticorps anti *R. equi* disponibles aujourd'hui, ne sont pas adaptées et standardisées. Pour caractériser la qualité des PHI, une méthode sérologique ciblant les anticorps d'intérêt et quantitative est à privilégier.

Enfin, l'administration de PHI à un poulain doit s'accompagner de mesures de surveillance et de prévention sanitaire. Ainsi, le GT recommande :

- de conduire, pour chaque élevage, une analyse afin de définir quels sont les moments d'administration les plus adaptés compte tenu des caractéristiques de l'élevage et des animaux,
- d'instaurer ou de maintenir une surveillance clinique étroite des poulains à risque, cibles à privilégier pour l'administration de PHI,
- de mettre en place des mesures sanitaires permettant une réduction de l'exposition à la bactérie, tant en fréquence qu'en intensité (moindre concentration de *R. equi* en aérosol).

L'état des connaissances scientifiques actuelles montre que des efforts de recherche importants doivent être conduits pour permettre une amélioration du niveau de protection contre la rhodococcose conféré par les PHI.

Les études devront porter sur les domaines et questions suivantes :

- **La qualité et la composition du PHI**
  - Quelle est la concentration optimale en µg/ml des anticorps totaux anti-VapA et anti-VapC ;
  - Quel est l'équilibre optimal entre les 3 isotypes d'IgG (IgGa, IgGb et IgG(T)) ;
  - Quels sont les facteurs sanguins (autres que les anticorps) qui jouent un rôle dans la protection conférée par le PHI et à quelles concentrations.
- **Les conditions de production du PHI**
  - Sur quels critères (caractéristiques immunitaires) fonder le choix d'un donneur de PHI ;
  - Quelle est la préparation idéale pour l'immunisation du cheval donneur (choix de la solution antigénique et de l'adjuvant) et quel protocole d'immunisation mettre en œuvre (voie d'administration, dose, nombre d'administrations) pour obtenir des concentrations plasmatiques optimales en anticorps et autres facteurs sanguins.
  - Etudier l'intérêt d'enrichir les PHI obtenus à partir de donneurs équins adultes avec des anticorps monoclonaux anti-VapA et anti-VapC de manière à garantir des concentrations suffisantes et efficaces de ces anticorps dans les PHI.

- **Les conditions d'administration au poulain et les caractéristiques de l'immunité passive à atteindre**
  - Quelle est la concentration sanguine minimale en anticorps anti-VapA et anti-VapC à maintenir chez le poulain pendant toute la période à risque ;
  - Quel est le protocole d'administration du PHI le plus adapté pour obtenir ce résultat.

### 3.6.3. Vaccin

A ce jour, aucun vaccin conventionnel n'est disponible commercialement pour prévenir la rhodococcose.

Le caractère intracellulaire de *R. equi*, les spécificités du système immunitaire chez le poulain nouveau-né et la présence potentielle d'anticorps maternels représentent des écueils significatifs pour le développement d'un vaccin immunogène et protecteur.

En effet, malgré le design, le développement et la caractérisation de nombreuses stratégies de vaccination contre la rhodococcose au cours des 25 dernières années, ainsi que la mise en place de nombreuses études cliniques chez l'espèce cible, il n'y a à ce jour que peu ou pas de consensus sur la meilleure approche technologique à adopter pour prévenir l'infection par *R. equi* chez le jeune poulain par un vaccin. Cet état de fait est une conséquence de la complexité de cette pathologie. De nombreux éléments restent à définir, comme la sélection du ou des antigènes vaccinaux, l'ajout d'un adjuvant et sa nature, la méthode et la fréquence d'administration du vaccin, etc ...

Outre ces éléments propres au vaccin, des difficultés majeures sont rencontrées pour leur évaluation, comme la complexité du modèle expérimental animal à utiliser, la paucité des corrélats de protection, l'impact certain de l'âge sur la réponse immunitaire et la protection contre *R. equi* mais dont les mécanismes restent encore mal compris et définis.

D'autres difficultés sont à noter comme l'existence possible de différences individuelles en termes de sensibilité à l'infection et de développement des signes cliniques de la maladie, ou les facteurs environnementaux et les dynamiques de populations pour les études de terrain.

Autant d'incertitudes pesant aujourd'hui sur le dossier « vaccination rhodococcose » et qui constituent des pistes de recherche à initier.

- A l'exception de rares publications dont les résultats seraient à confirmer, la littérature scientifique montre globalement que l'approche vaccinale à base de bactéries complètes inactivées n'est pas adaptée à *R. equi*.
- L'approche vaccinale à base de bactéries vivantes atténuées, avec une administration par voie orale, a présenté des résultats encourageants en termes de protection. L'expérience acquise avec les vaccins vivants atténués contre la Gourme (*Streptococcus equi*) nous informe néanmoins que ce type de plateforme requiert un équilibre précis entre les notions d'efficacité et d'innocuité.
- La stratégie de vaccination basée sur une sélection d'antigènes d'intérêt, dont VapA et VapC, a donné des résultats encourageants en termes d'immunogénicité chez la jument et le poulain, ainsi qu'une protection significative dans un contexte d'infection naturelle. Cette approche semble être à ce jour la plus prometteuse.
- L'emploi de vecteurs viraux recombinants exprimant un ou plusieurs antigènes d'intérêt est une approche vaccinale qui a fait ses preuves chez de nombreuses espèces, dont le cheval dans le cas de la grippe équine et la fièvre du Nil Occidental. Ce type de plateforme vaccinale pourrait également être évalué dans le cadre de la rhodococcose.

#### 3.6.4. Autovaccins

Bon nombre d'incertitudes pèsent également sur la question de l'efficacité des autovaccins pour prévenir cette maladie. Comme pour les vaccins, le caractère intracellulaire de *R. equi* et les spécificités du système immunitaire chez le poulain nouveau-né rendent délicate l'entreprise de produire un autovaccin efficace.

L'intérêt d'associer dans un même autovaccin, différentes souches de *R. equi* prélevées dans un élevage, a été discuté par le GT. Les données scientifiques actuellement disponibles ne suggèrent pas que des différences de pouvoir pathogène puissent exister entre les souches de *R. equi* virulentes d'origine équine en fonction du type plasmidique. Au sein des plasmides pVapA, un type plasmidique plutôt qu'un autre ne peut donc être recommandé pour la production des autovaccins.

En revanche, le nombre de copies du plasmide présentes dans l'isolat ou la capacité de la souche à produire un grand nombre de copies du plasmide pourraient être des paramètres à explorer.

Par ailleurs, la bibliographie disponible indique que si des complexes clonaux distincts existent parmi les souches de *R. equi* d'origine équine, ils ne sont pas nécessairement associés à un pouvoir pathogène différent. Si ces résultats ne permettent pas de sélectionner plus particulièrement une souche pVapA à inclure dans l'autovaccin selon son complexe clonal, rien ne s'oppose à inclure plusieurs souches pVapA appartenant à des complexes clonaux distincts dans l'autovaccin.

Le GT souligne avant tout l'importance de vérifier la présence du plasmide de virulence sur la (les) souche(s) prélevée(s) en élevage et juste avant la préparation de l'autovaccin, ainsi que la présence de la protéine VapA dans la préparation antigénique.

Le recours à un adjuvant, au-delà de la propension particulière de l'espèce équine à développer des réactions locales, doit également prendre en compte l'orientation immunitaire induite par le produit. S'il s'agit d'une question complexe en lien avec le mode d'action des adjuvants, il importe néanmoins de vérifier que la voie Th1 est privilégiée.

En l'état actuel des connaissances et en l'absence d'études cliniques spécifiques, les experts estiment que l'administration d'un autovaccin au poulain de moins de 3 mois ne peut être recommandée si sa mère a elle-même été immunisée avec le même autovaccin en fin de gestation et que le transfert d'immunité colostrale a été satisfaisant.

En outre, les experts soulignent l'absence actuelle d'outils de « pilotage » pour améliorer l'efficacité de ces auto-vaccins,

- même si la plus-value de l'utilisation de plusieurs souches virulentes dans un autovaccin n'est pas avérée, il pourrait être utile de développer des outils de caractérisation de routine pour mieux suivre la circulation des différents clones au sein d'un élevage et pouvoir ainsi introduire des souches appartenant à ces complexes clonaux différents dans l'autovaccin.
- en termes de vérification de l'efficacité vaccinale et d'élaboration des protocoles d'administration des autovaccins : le développement et la standardisation de méthodes sérologiques permettant une quantification fiable des anticorps d'intérêt seraient nécessaires afin de pouvoir suivre de façon plus fine la cinétique des anticorps produits, en fonction des doses administrées et des protocoles testés, dans le cadre d'une étude d'efficacité des autovaccins.

#### 3.6.5. Diagnostic

Le diagnostic de la maladie est un point central dans la gestion de la rhodococcose.

La seule méthode diagnostique de certitude reconnue est la détection de *R. equi* par PCR ou culture bactériologique dans le liquide de lavage trachéal.

Les méthodes de détection d'une pneumonie abcédative (diagnostic de suspicion) sont la radiographie thoracique, qui est difficile à réaliser en pratique, l'échographie thoracique ainsi que la réalisation d'une numération de formule sanguine et un dosage du fibrinogène sanguin.

De nombreux auteurs ont étudié différentes méthodes sérologiques (ELISA, AGID) pour le diagnostic de la rhodococcose chez le poulain et, compte tenu des résultats, la conférence de consensus tenue par l'ACVIM<sup>7</sup> en 2011 a conclu que l'état actuel des connaissances, en matière de sensibilité et de spécificité des méthodes, ne permet de recommander aucun des tests sérologiques disponibles dans le diagnostic des pneumonies à *R. equi*.

### **3.6.6. Prise en charge médicale**

La prise en charge médicale fait appel à la prescription d'antibiotiques. *R. equi* étant une bactérie intracellulaire facultative, elle nécessite l'utilisation d'antibiotiques à bonne pénétration intracellulaire pour la détruire. Réglementairement, les antibiotiques utilisés dans le traitement de cette infection ne sont pas souvent disponibles comme médicaments vétérinaires. Ils font donc l'objet de restriction d'utilisation.

Pour l'instant, il n'existe pas d'alternative de traitement à la combinaison macrolide/rifampicine. Or, la rifampicine fait partie des substances antibiotiques d'importance critique visées par l'article R. 5141-117-3-I du Code de Santé Publique, dont la prescription en médecine vétérinaire équine n'est autorisée que parce qu'elle figure dans la liste des substances essentielles pour les équidés. De ce fait, son utilisation chez les équidés est subordonnée à :

- un examen clinique préalable (et une analyse du contexte épidémiologique) ;
- la réalisation préalable d'un examen complémentaire visant à identifier la souche bactérienne, qui pourra être, dans le cadre de la rhodococcose, la mise en culture d'un liquide de lavage trachéal, ou de tout autre prélèvement en fonction du site d'infection ;
- la réalisation préalable d'un antibiogramme.

L'amélioration de la prise en charge médicale de cette maladie passe par l'acquisition de nouvelles connaissances sur des méthodes diagnostiques rapides (sérologie), sur des molécules antibiotiques alternatives à la rifampicine et sur des études cliniques relatives à la durée nécessaire des traitements.

Enfin, le CES a rappelé les dispositions réglementaires encadrant les autres moyens de prévention et de lutte contre la rhodococcose, qu'il s'agisse de vaccin, d'autovaccin ou de plasma hyperimmun, soulignant notamment que les plasmas hyper-immuns contre la rhodococcose répondent, comme les vaccins et les autovaccins, à la définition d'un médicament vétérinaire.

---

<sup>7</sup> ACVIM : American College of Veterinary Internal Medicine

#### **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES Santé et Bien-être des animaux relatives aux méthodes de prévention et de lutte contre la rhodococcose du poulain.

Dr Roger Genet

#### **MOTS-CLES**

Cheval, poulain, rhodococcose, *Rhodococcus equi*, vaccin, autovaccin, plasma hyperimmun, diagnostic, antibiotique, lutte sanitaire

Horse, foal, rhodococcosis, *Rhodococcus equi*, vaccine, autovaccine, hyperimmune plasma, diagnosis, antimicrobial, disease control

## BIBLIOGRAPHIE

- Aleman, Monica, Jorge E Nieto, Elizabeth A Carr, et Gary P Carlson. 2005. "Serum hepatitis associated with commercial plasma transfusion in horses." *Journal of veterinary internal medicine* 19 (1):120-122.
- Anastasi, Elisa, Iain MacArthur, Mariela Scotti, Sonsiray Alvarez, Steeve Giguère, et José A Vázquez-Boland. 2016. "Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*." *Genome biology and evolution* 8 (10):3140-3148.
- Anzai, T, R Wada, A Nakanishi, M Kamada, S Takai, Y Shindo, et S Tsubaki. 1997. "Comparison of tracheal aspiration with other tests for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals." *Veterinary microbiology* 56 (3-4):335-345.
- Attili, AR, E Kennerman, S Takai, ME Or, ML Marenzoni, S Torun, C Pieramati, A Kayar, E Golcu, et Ç Parkan. 2006. "Seroepidemiological survey of *Rhodococcus equi* infection in asymptomatic horses from Bursa, Izmir and Istanbul provinces, Turkey." *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 29 (5):323-333.
- Aucouturier, J., L. Dupuis, et V. Ganne. 2001. "Adjuvants designed for veterinary and human vaccines." *Vaccine* 19 (17):2666-2672. doi: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00498-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00498-9).
- Barbey, Corinne, Aurélie Budin-Verneuil, Séverine Cauchard, Axel Hartke, Claire Laugier, Vianney Pichereau, et Sandrine Petry. 2009. "Proteomic analysis and immunogenicity of secreted proteins from *Rhodococcus equi* ATCC 33701." *Veterinary microbiology* 135 (3):334-345.
- Barton, Mary D, et KL Hughes. 1982. "Is *Rhodococcus equi* a soil organism." *J. Reprod. Fertil. Suppl* 32:481-489.
- Barton, MD, et KL Hughes. 1984. "Ecology of *Rhodococcus equi*." *Veterinary microbiology* 9 (1):65-76.
- Båverud, V, A Franklin, A Gunnarsson, A Gustafsson, et A Hellander-Edman. 1998. "Clostridium difficile associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia." *Equine veterinary journal* 30 (6):482-488.
- Becu, T, G Polledo, et JM Gaskin. 1997. "Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals." *Veterinary microbiology* 56 (3):193-204.
- Belák, S, V Palfi, S Tuboly, et L Bartha. 1980. "Passive immunization of foals to prevent respiratory disease caused by equine herpesvirus type 2." *Zoonoses and Public Health* 27 (9-10):826-830.
- Benoit, Stéphanie, Saïd Taouji, Abdellah Benachour, et Axel Hartke. 2000. "Resistance of *Rhodococcus equi* to acid pH." *International journal of food microbiology* 55 (1-3):295-298.
- Berghaus, LJ, S Giguere, TL Sturgill, D Bade, TJ Malinski, et R Huang. 2012. "Plasma pharmacokinetics, pulmonary distribution, and in vitro activity of gamithromycin in foals." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 35 (1):59-66.
- Berghaus, Londa J, Steeve Giguère, et Kristen Guldbach. 2013. "Mutant prevention concentration and mutant selection window for 10 antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*." *Veterinary microbiology* 166 (3):670-675.
- Berlin, S, T Randow, E Scheuch, M Grube, M Venner, et W Siegmund. 2017. "Pharmacokinetics and pulmonary distribution of gamithromycin after intravenous administration in foals." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*.

- Berlin, Sarah, Lena Spieckermann, Stefan Oswald, Markus Keiser, Stefan Lumpe, Anett Ullrich, Markus Grube, Mahmoud Hasan, Monica Venner, et Werner Siegmund. 2016. "Pharmacokinetics and pulmonary distribution of clarithromycin and rifampicin after concomitant and consecutive administration in foals." *Molecular pharmaceuticals* 13 (3):1089-1099.
- Bordin, Angela I, Suresh D Pillai, Courtney Brake, Kaytee B Bagley, Jessica R Bourquin, Michelle Coleman, Fabiano N Oliveira, Waithaka Mwangi, David N McMurray, et Charles C Love. 2014. "Immunogenicity of an electron beam inactivated *Rhodococcus equi* vaccine in neonatal foals." *PloS one* 9 (8):e105367.
- Brandon, RB, R Hill, et RP Wilson. 2009. "Development of hyperimmune equine plasma to virulence associated protein A (VapA) of *Rhodococcus equi*." *Plasvacc White Paper*.
- Breathnach, C. C., T. Sturgill-Wright, J. L. Stiltner, A. A. Adams, D. P. Lunn, et D. W. Horohov. 2006. "Foals are interferon gamma-deficient at birth." *Vet Immunol Immunopathol* 112 (3-4):199-209. doi: S0165-2427(06)00066-3 [pii] 10.1016/j.vetimm.2006.02.010.
- Burrows, GE, CG MacAllister, P Ewing, E Stair, et PW Tripp. 1992. "Rifampin disposition in the horse: effects of age and method of oral administration." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 15 (2):124-132.
- Burton, AJ, S Giguère, et RD Arnold. 2015. "Pharmacokinetics, pulmonary disposition and tolerability of liposomal gentamicin and free gentamicin in foals." *Equine veterinary journal* 47 (4):467-472.
- Burton, Alexandra J, Steeve Giguère, Londa J Berghaus, et Mary K Hondalus. 2015. "Activity of clarithromycin or rifampin alone or in combination against experimental *Rhodococcus equi* infection in mice." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (6):3633-3636.
- Burton, Alexandra J, Steeve Giguère, Londa J Berghaus, Mary K Hondalus, et Robert D Arnold. 2015. "Efficacy of liposomal gentamicin against *Rhodococcus equi* in a mouse infection model and colocalization with *R. equi* in equine alveolar macrophages." *Veterinary microbiology* 176 (3):292-300.
- Burton, Alexandra J, Steeve Giguère, Tracy L Sturgill, Londa J Berghaus, Nathan M Slovis, Jeremy L Whitman, Court Levering, Kyle R Kuskie, et Noah D Cohen. 2013. "Macrolide- and rifampin-resistant *Rhodococcus equi* on a horse breeding farm, Kentucky, USA." *Emerging infectious diseases* 19 (2):282.
- Caston, Stephanie S, Scott R McClure, Ronald J Martens, M Keith Chaffin, Kristina G Miles, Ronald W Griffith, et Noah D Cohen. 2006. "Effect of hyperimmune plasma on the severity of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in experimentally infected foals." *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine* 7 (4):361-375.
- Cauchard, Julien, Corinne Sevin, Jean-Jacques Ballet, et Saïd Taouji. 2004. "Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine." *Veterinary microbiology* 104 (1-2):73-81.
- Cauchard, Julien, Saïd Taouji, Corinne Sevin, Fabien Duquesne, Magali Bernabé, Claire Laugier, et Jean Jacques Ballet. 2006. "Immunogenicity of synthetic *Rhodococcus equi* virulence-associated protein peptides in neonate foals." *International journal of medical microbiology* 296 (6):389-396.

- Cauchard, S, F Bertrand, I Barrier-Battut, S Jacquet, Michel Laurentie, C Barbey, C Laugier, S Deville, et J Cauchard. 2014. "Assessment of the safety and immunogenicity of *Rhodococcus equi*-secreted proteins combined with either a liquid nanoparticle (IMS 3012) or a polymeric (PET GEL A) water-based adjuvant in adult horses and foals—Identification of promising new candidate antigens." *Veterinary immunology and immunopathology* 157 (3):164-174.
- Cauchard, S., S. Giguere, M. Venner, G. Muscatello, J. Cauchard, N. D. Cohen, A. Haas, S. A. Hines, M. K. Hondalus, D. W. Horohov, W. G. Meijer, J. F. Prescott, et J. Vazquez-Boland. 2013. "Rhodococcus equi research 2008-2012: report of the Fifth International Havemeyer Workshop." *Equine Veterinary Journal* 45 (5):523-6. doi: 10.1111/evj.12103.
- Cesar, FB, MS Sanz, EH Martinez, et DW Horohov. 2016. "Variation of anti-Rhodococcus equi VapA specific IgGs among eleven different lots of one commercially available Rhodococcus equi specific hyperimmune plasma product." *Journal of equine veterinary science* 39:S85-S86.
- Chaffin, M Keith, Noah D Cohen, Glenn P Blodgett, et Melissa Syndergaard. 2013. "Evaluation of hematologic screening methods for predicting subsequent onset of clinically apparent Rhodococcus equi pneumonia in foals." Proceedings of the 59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Nashville, Tennessee, USA, 7-11 December 2013.
- Chaffin, M. Keith, Noah D. Cohen, Ronald J. Martens, Ronnie F. Edwards, et Mark Nevill. 2003. "Foal-related risk factors associated with development of Rhodococcus equi pneumonia on farms with endemic infection." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223 (12):1791-1799. doi: 10.2460/javma.2003.223.1791.
- Chaffin, MK, RJ Martens, Judy G Martens, et RA Fiske. 1991. "Therapeutic effects of immune plasma in foals with Rhodococcus equi pneumonia." *Equine veterinary journal* 23 (S12):23-29.
- Chirino-Trejo, JM, JF Prescott, et JA Yager. 1987. "Protection of foals against experimental Rhodococcus equi pneumonia by oral immunization." *Canadian Journal of Veterinary Research* 51 (4):444.
- Cohen, ND, S Giguère, AJ Burton, JN Rocha, LJ Berghaus, CN Brake, AI Bordin, et MC Coleman. 2016. "Use of liposomal gentamicin for treatment of 5 foals with experimentally induced Rhodococcus equi pneumonia." *Journal of veterinary internal medicine* 30 (1):322-325.
- Cohen, Noah D. 2009. "Epidemiology of Rhodococcus equi pneumonia in foals. ." *Current therapy equine medicine*:129-131.
- Cohen, Noah D, Jessica R Bourquin, Angela I Bordin, Kyle R Kuskie, Courtney N Brake, Kaytee B Weaver, Mei Liu, M Julia B Felipe, et Michael H Kogut. 2014. "Intramuscular administration of a synthetic CpG-oligodeoxynucleotide modulates functional responses of neutrophils of neonatal foals." *PloS one* 9 (10):e109865.
- Cohen, Noah D, Craig N Carter, H Morgan Scott, M Keith Chaffin, Jacqueline L Smith, Michael B Grimm, Kyle R Kuskie, Shinji Takai, et Ronald J Martens. 2008. "Association of soil concentrations of Rhodococcus equi and incidence of pneumonia attributable to Rhodococcus equi in foals on farms in central Kentucky." *American journal of veterinary research* 69 (3):385-395.
- Cohen, Noah D, M Keith Chaffin, Kyle R Kuskie, Melissa K Syndergaard, Glenn P Blodgett, et Shinji Takai. 2013. "Association of perinatal exposure to airborne

- Rhodococcus equi with risk of pneumonia caused by R equi in foals." *American journal of veterinary research* 74 (1):102-109.
- Cohen, Noah D, M Keith Chaffin, et Ronald J Martens. 2002. "How to Prevent and Control Pneumonia Caused by Rhodococcus equi at Affected Farms." Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP).
- Cohen, Noah D, MK Chaffin, et RJ Martens. 2000. "Control and prevention of Rhodococcus equi pneumonia in foals." *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 22 (11):1062-1070.
- Cohen, Noah D, Kyle R Kuskie, Jacqueline L Smith, Nathan M Slovis, Stuart E Brown II, Randolph S Stepusin, M Keith Chaffin, Shinji Takai, et Craig N Carter. 2012. "Association of airborne concentration of virulent Rhodococcus equi with location (stall versus paddock) and month (January through June) on 30 horse breeding farms in central Kentucky." *American journal of veterinary research* 73 (10):1603-1609.
- Cohen, Noah D, Nathan M Slovis, Steeve Giguere, Samantha Baker, M Keith Chaffin, et Lawrence R Bernstein. 2015. "Gallium maltolate as an alternative to macrolides for treatment of presumed Rhodococcus equi pneumonia in foals." *Journal of veterinary internal medicine* 29 (3):932-939.
- Cohen, Noah D. 2014a. "Prevention and control of Rhodococcus equi foal pneumonia." Focus on the first year of life, Phoenix, AZ, USA
- Cohen, Noah D. 2014b. "Rhodococcus equi foal pneumonia." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 30 (3):609-622.
- Cohen, Noah D., MK Chaffin, ML Vandenplas, RF Edwards, M Nevill, JN Moore, et RJ Martens. 2005. "Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of Rhodococcus equi pneumonia." *Equine veterinary journal* 37 (3):212-216.
- Cohen, Noah D., Michael S. O'Connor, M. Keith Chaffin, et Ronald J. Martens. 2005. "Farm characteristics and management practices associated with development of Rhodococcus equi pneumonia in foals." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226 (3):404-413. doi: 10.2460/javma.2005.226.404.
- Cohen, Noah D., et G Pier. 2017.
- Collobert, C, M Foursin, AC Fabry, G TARIEL, C LAMIDEY, N FOUCHER, G FORTIER, et C MOUSSU. 1998. "Infection à Rhodococcus equi chez le poulain à l'autopsie: importance des localisations ostéoarticulaires et musculaires." *Prat. vét. équine* 30:27-34.
- Cuteri, V, S Takai, L Moscati, L Battistacci, C Pieramati, et C Valente. 2003. "A serological survey of Rhodococcus equi infection in foals in central Italy: comparison of two antigens using an ELISA test." *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 26 (1):17-23.
- Darrah, Patricia A, Mary K Hondalus, Quiping Chen, Harry Ischiropoulos, et David M Mosser. 2000. "Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of Rhodococcus equi by activated macrophages." *Infection and immunity* 68 (6):3587-3593.
- Darrah, Patricia A, Maria Chiara G Monaco, Shruti Jain, Mary K Hondalus, Douglas T Golenbock, et David M Mosser. 2004. "Innate immune responses to Rhodococcus equi." *The Journal of Immunology* 173 (3):1914-1924.

- Davis, JL, SY Gardner, SL Jones, BA Schwabenton, et MG Papich. 2002. "Pharmacokinetics of azithromycin in foals after iv and oral dose and disposition into phagocytes." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 25 (2):99-104.
- Dawson, D, MJBFL Flaminio, D Nydam, JE Graham, M Cynamon, et TJ Divers. 2009. "Opsonization of *Rhodococcus equi* with high antibody plasma decreases bacterial viability and promotes phagocyte activation. ." American College of Veterinary Internal Medicine Forum, Montreal, Quebec (Canada).
- Dawson, Tamsin RMY, David W Horohov, Wim G Meijer, et Gary Muscatello. 2010. "Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia." *Veterinary immunology and immunopathology* 135 (1):1-11.
- Demmers, S, A Johannisson, G Gröndahl, et M JENSEN-WAERN. 2001. "Neutrophil functions and serum IgG in growing foals." *Equine veterinary journal* 33 (7):676-680.
- Dunowska, M, J Meers, RD Johnson, et CR Wilks. 2001. "Influence of equine herpesvirus type 2 infection on monocyte chemoattractant protein 1 gene transcription in equine blood mononuclear cells." *Research in veterinary science* 71 (2):111-113.
- Duquesne, Fabien, Laurent Hébert, Corinne Sévin, Marie-France Breuil, Jackie Tapprest, Claire Laugier, et Sandrine Petry. 2010. "Analysis of plasmid diversity in 96 *Rhodococcus equi* strains isolated in Normandy (France) and sequencing of the 87-kb type I virulence plasmid." *FEMS microbiology letters* 311 (1):76-81.
- Duquesne, Fabien, Emilie Houssin, Corinne Sévin, Lucille Duytschaever, Jackie Tapprest, David Fretin, Laurent Hébert, Claire Laugier, et Sandrine Petry. 2017. "Development of a multilocus sequence typing scheme for *Rhodococcus equi*." *Veterinary microbiology* 210:64-70.
- Edmonds, JD, DW Horohov, MR Chapman, SS Pourciau, K Antoku, K Snedden, et TR Klei. 2001. "Altered immune responses to a heterologous protein in ponies with heavy gastrointestinal parasite burdens." *Equine veterinary journal* 33 (7):658-663.
- Erganis, Osman, Zafer Sayin, Hasan Huseyin Hadimli, Asli Sakmanoglu, Yasemin Pinarkara, Ozgur Ozdemir, et Mehmet Maden. 2014. "The effectiveness of anti-*R. equi* hyperimmune plasma against *R. equi* challenge in thoroughbred Arabian foals of mares vaccinated with *R. equi* vaccine." *The Scientific World Journal* 2014.
- Fernandez-Mora, Eugenia, Marco Polidori, Anja Lührmann, Ulrich E Schaible, et Albert Haas. 2005. "Maturation of *Rhodococcus equi*-containing vacuoles is arrested after completion of the early endosome stage." *Traffic* 6 (8):635-653.
- Fernandez, AS, JF Prescott, et VM Nicholson. 1997. "Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA)-enriched antigens." *Veterinary microbiology* 56 (3-4):187-192.
- Ferry, B. 2017. "Mieux faire face à la rhodococcose du poulain." IFCE. <http://www.ifce.fr/wp-content/uploads/2017/04/DIFF-Webconf-BF-rhodo-poulain.pdf>.
- Ferry, Bénédicte, et J.M. Baradeau. 2010. "Actualités en élevage équin. Prévention contre la rhodococcose dans les Haras nationaux : Comment assainir l'environnement du poulain ? ." *Equ'idée* 70:52-54.
- Ferry, Bénédicte, et Jackie Tapprest. 2012. "La rhodococcose pulmonaire : études des facteurs de risque et des moyens de prévention sanitaire. ." *Bulletin épidémiologique santé animale et alimentation* 49:42-44.

- Fines, Marguerite, Stephane Pronost, Karine Maillard, Said Taouji, et Roland Leclercq. 2001. "Characterization of Mutations in the rpoB Gene Associated with Rifampin Resistance in Rhodococcus equi isolated from Foals." *Journal of clinical microbiology* 39 (8):2784-2787.
- Flaminio, M Julia B Felippe. 2010. "Immunity to Rhodococcus equi." Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, Maryland, USA, 4-8 December 2010.
- Fougerolle, Stéphanie, Loïc Legrand, Dion Garrett, Ilhan Birand, Marc Foursin, Xavier D'Ablon, Pierre Bayssat, Richard J Newton, Stéphane Pronost, et Romain Paillot. 2016. "Influential factors inducing suboptimal humoral response to vector-based influenza immunisation in Thoroughbred foals." *Vaccine* 34 (33):3787-3795.
- Franz, LC, JC Landon, LA Lopes, LA Marinho, C Sarma, J Bruemmer, et EL Squires. 1998. "Oral and intravenous immunoglobulin therapy in neonatal foals." *Journal of equine veterinary science* 18 (11):742-748.
- Freestone, JF., S. Hietala, J. Moulton, et S. Vivrette. 1987. "Acquired immunodeficiency in a seven-year-old horse." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 190 (6):689-691.
- Garton, Natalie J, Martine Gilleron, Thérèse Brando, Han-Hong Dan, Steeve Giguère, Germain Puzo, John F Prescott, et Iain C Sutcliffe. 2002. "A Novel Lipoarabinomannan from the Equine Pathogen Rhodococcus equi STRUCTURE AND EFFECT ON MACROPHAGE CYTOKINE PRODUCTION." *Journal of Biological Chemistry* 277 (35):31722-31733.
- Giguère, S, LJ Berghaus, et CD Miller. 2016. "Clinical Assessment of a Point-of-Care Serum Amyloid A Assay in Foals with Bronchopneumonia." *Journal of veterinary internal medicine* 30 (4):1338-1343.
- Giguere, S, ND Cohen, M Keith Chaffin, SA Hines, MK Hondalus, JF Prescott, et NM Slovis. 2011. "Rhodococcus equi: clinical manifestations, virulence, and immunity." *Journal of veterinary internal medicine* 25 (6):1221-1230.
- Giguère, S, ND Cohen, M Keith Chaffin, NM Slovis, MK Hondalus, SA Hines, et JF Prescott. 2011. "Diagnosis, treatment, control, and prevention of infections caused by Rhodococcus equi in foals." *Journal of veterinary internal medicine* 25 (6):1209-1220.
- Giguère, S, et S Jacks. 2005. "Therapy and Control of Rhodococcus equi Infections in Foals." Third World Equine Airways Symposium.
- Giguère, S, et JF Prescott. 1997. "Strategies for the control of Rhodococcus equi infections on enzootic farms." Proceedings.
- Giguere, S., B. N. Wilkie, et J. F. Prescott. 1999. "Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent Rhodococcus equi." *Infection and Immunity* 67 (10):5041-7.
- Giguere, Steeve. 2001. "Rhodococcus equi pneumonia." Proc AAEP.
- Giguère, Steeve. 2017. "Treatment of Infections Caused by Rhodococcus equi." *Veterinary Clinics: Equine Practice* 33 (1):67-85.
- Giguère, Steeve, Jack M Gaskin, Corey Miller, et James L Bowman. 2002. "Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by Rhodococcus equi in foals." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220 (1):59-63.
- Giguère, Steeve, Jorge Hernandez, Jack Gaskin, Corey Miller, et James L Bowman. 2003. "Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen

- concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222 (6):775-781.
- Giguère, Steeve, Jorge Hernandez, Jack Gaskin, John F Prescott, Shinji Takai, et Corey Miller. 2003. "Performance of five serological assays for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 10 (2):241-245.
- Giguère, Steeve, Mary K Hondalus, Julie A Yager, Patricia Darrah, David M Mosser, et John F Prescott. 1999. "Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*." *Infection and immunity* 67 (7):3548-3557.
- Giguère, Steeve, Stephanie Jacks, Gregory D Roberts, Jorge Hernandez, Maureen T Long, et Christina Ellis. 2004. "Retrospective comparison of azithromycin, clarithromycin, and erythromycin for the treatment of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia." *Journal of veterinary internal medicine* 18 (4):568-573.
- Giguère, Steeve, Elise A Lee, Kristen M Guldbach, et Londa J Berghaus. 2012. "In vitro synergy, pharmacodynamics, and postantibiotic effect of 11 antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*." *Veterinary microbiology* 160 (1):207-213.
- Giguère, Steeve, Elise Lee, Elliott Williams, Noah D Cohen, M Keith Chaffin, Natalie Halbert, Ronald J Martens, Robert P Franklin, Carol C Clark, et Nathan M Slovis. 2010. "Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R. equi*." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 237 (1):74-81.
- Giguère, Steeve, et John F Prescott. 1998. "Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*." *Infection and immunity* 66 (5):1848-1854.
- Giguère, Steeve, et Gregory D Roberts. 2012. "Association between radiographic pattern and outcome in foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi*." *Veterinary Radiology & Ultrasound* 53 (6):601-604.
- Giles, Carla, T Vanniasinkam, S Ndi, et MD Barton. 2015. "*Rhodococcus equi* (Prescottella equi) vaccines; the future of vaccine development." *Equine veterinary journal* 47 (5):510-518.
- González-Iglesias, Patricia, Mariela Scotti, Iain MacArthur, Alexia Hapeshi, Héctor Rodríguez, John F Prescott, et José A Vazquez-Boland. 2014. "Mouse lung infection model to assess *Rhodococcus equi* virulence and vaccine protection." *Veterinary microbiology* 172 (1):256-264.
- Gröndahl, Gittan, Anders Johannisson, Susanne Demmers, et Marianne Jensen Waern. 1999. "Influence of age and plasma treatment on neutrophil phagocytosis and CD18 expression in foals." *Veterinary microbiology* 65 (3):241-254.
- Gröndahl, Gittan, Anders Johannisson, et Marianne Jensen-Waern. 1997. "Opsonic effect of equine plasma from different donors." *Veterinary microbiology* 56 (3):227-235.
- Gustafsson, A, V BaËverud, A Gunnarsson, M Rantzien, A Lindholm, et A Franklin. 1997. "The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden." *Equine veterinary journal* 29 (4):314-318.
- Hamza, E., V. Gerber, F. Steinbach, et E. Marti. 2011. "Equine CD4(+) CD25(high) T cells exhibit regulatory activity by close contact and cytokine-dependent mechanisms in vitro." *Immunology* 134 (3):292-304. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03489.x.

- Hamza, E., J. Mirkovitch, F. Steinbach, et E. Marti. 2015. "Regulatory T cells in early life: comparative study of CD4+CD25high T cells from foals and adult horses." *PLoS One* 10 (3):e0120661. doi: 10.1371/journal.pone.0120661
- PONE-D-14-41181 [pii].
- Hamza, Eman, Sigurbjörg Torsteinsdóttir, Matthías Eydal, Caroline F Frey, Jelena Mirkovitch, Marja Brcic, Bettina Wagner, A Douglas Wilson, Thomas W Jungi, et Eliane Marti. 2010. "Increased IL-4 and decreased regulatory cytokine production following relocation of Icelandic horses from a high to low endoparasite environment." *Veterinary immunology and immunopathology* 133 (1):40-50.
- Hannant, D, T O'Neill, EN Ostlund, JH Kydd, PJ Hopkin, et JA Mumford. 1999. "Equid herpesvirus-induced immunosuppression is associated with lymphoid cells and not soluble circulating factors." *Viral immunology* 12 (4):313-321.
- Hardefeldt, Laura Y, Nicholas Keuler, et Simon F Peek. 2010. "Retrospective Study: Incidence of transfusion reactions to commercial equine plasma." *Journal of veterinary emergency and critical care* 20 (4):421-425.
- Harris, S. P., N. Fujiwara, R. H. Mealey, D. C. Alperin, T. Naka, R. Goda, et S. A. Hines. 2010. "Identification of Rhodococcus equi lipids recognized by host cytotoxic T lymphocytes." *Microbiology* 156 (Pt 6):1836-47. doi: 10.1099/mic.0.035915-0.
- Harris, S. P., M. T. Hines, R. H. Mealey, D. C. Alperin, et S. A. Hines. 2011. "Early development of cytotoxic T lymphocytes in neonatal foals following oral inoculation with Rhodococcus equi." *Vet Immunol Immunopathol* 141 (3-4):312-6. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.03.015.
- Hashikura, S, T Higuchi, S Taharaguchi, Y Orita, Y Nanao, et S Takai. 2000. "Evaluation of nasotracheal aspiration as a diagnostic tool for Rhodococcus equi pneumonia in foals." *Equine veterinary journal* 32 (6):560-564.
- Hébert, Laurent, Pauline Bidaud, Didier Goux, Abdellah Benachour, Claire Laugier, et Sandrine Petry. 2014. "Study of Lysozyme Resistance in Rhodococcus equi." *Current microbiology* 68 (3):352-357.
- Heidmann, Peter, John E Madigan, et Johanna L Watson. 2006. "Rhodococcus equi pneumonia: clinical findings, diagnosis, treatment and prevention." *Clinical Techniques in Equine Practice* 5 (3):203-210.
- Hietala, SK, AA Ardans, et A Sansome. 1985. "Detection of Corynebacterium equi-specific antibody in horses by enzyme-linked immunosorbent assay." *American journal of veterinary research* 46 (1):13-15.
- Higuchi, T, T Arakawa, S Hashikura, T Inui, H Senba, et S Takai. 1999. "Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent Rhodococcus equi infection on foals from endemically affected farms." *Zoonoses and Public Health* 46 (9):641-648.
- Hildebrand, Franziska, Monica Venner, et Steeve Giguère. 2015. "Efficacy of gamithromycin for the treatment of foals with mild to moderate bronchopneumonia." *Journal of veterinary internal medicine* 29 (1):333-338.
- Hines, M. T., K. M. Paasch, D. C. Alperin, G. H. Palmer, N. C. Westhoff, et S. A. Hines. 2001. "Immunity to Rhodococcus equi: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses." *Vet Immunol Immunopathol* 79 (1-2):101-14. doi: S0165-2427(01)00258-6 [pii].
- Hines, MT. 2014. "Rhodococcus equi." Dans *Equine Infectious Diseases*, édité par Long MT Sellon DC, 287-302. : Saunders Elsevier.

- Hines, S. A., D. M. Stone, M. T. Hines, D. C. Alperin, D. P. Knowles, L. K. Norton, M. J. Hamilton, W. C. Davis, et T. C. McGuire. 2003. "Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4+ and CD8+ T lymphocytes." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10 (2):208-15.
- Hondalus, Mary K. 1997. "Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*." *Veterinary microbiology* 56 (3-4):257-268.
- Hondalus, Mary K, et David M Mosser. 1994. "Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages." *Infection and immunity* 62 (10):4167-4175.
- Hooper-McGrevy, Kathleen E, Steve Giguere, Bruce N Wilkie, et John F Prescott. 2001. "Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia." *American journal of veterinary research* 62 (8):1307-1313.
- Hooper-McGrevy, Kathleen E, Bruce N Wilkie, et John F Prescott. 2003. "Immunoglobulin G subisotype responses of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 10 (3):345-351.
- Hooper-McGrevy, KE, BN Wilkie, et JF Prescott. 2005. "Virulence-associated protein-specific serum immunoglobulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent *R. equi*." *Vaccine* 23 (50):5760-5767.
- Horin, P, K Sabakova, J Futas, L Vychodilova, et M Necesankova. 2010. "Immunity-related gene single nucleotide polymorphisms associated with *Rhodococcus equi* infection in foals." *International journal of immunogenetics* 37 (2):67-71.
- Horowitz, Miriam L, Noah D Cohen, Shinji Takai, Teotimu Becu, M Keith Chaffin, Karin K Chu, K Gary Magdesian, et Ronald J Martens. 2001. "Application of Sartwell's model (lognormal distribution of incubation periods) to age at onset and age at death of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia as evidence of perinatal infection." *Journal of veterinary internal medicine* 15 (3):171-175.
- Hughes, KL, et I Sulaiman. 1987. "The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth." *Veterinary microbiology* 14 (3):241-250.
- Hurley, JR, et AP Begg. 1995. "Failure of hyperimmune plasma to prevent pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals." *Australian veterinary journal* 72 (11):418-420.
- Jacks, Stephanie, et Steeve Giguère. 2010. "Effects of inoculum size on cell-mediated and humoral immune responses of foals experimentally infected with *Rhodococcus equi*: a pilot study." *Veterinary immunology and immunopathology* 133 (2):282-286.
- Jacks, Stephanie, Steeve Giguère, P Cynda Crawford, et William L Castleman. 2007. "Experimental infection of neonatal foals with *Rhodococcus equi* triggers adult-like gamma interferon induction." *Clinical and Vaccine Immunology* 14 (6):669-677.
- Jacks, Stephanie, Steeve Giguère, et John F Prescott. 2007. "In vivo expression of and cell-mediated immune responses to the plasmid-encoded virulence-associated proteins of *Rhodococcus equi* in foals." *Clinical and Vaccine Immunology* 14 (4):369-374.
- Jacobs, A.A., R. Grommen, G. Hessels, L. Dijkhuizen, et R. Van der Geize. 2012. "Studie über einen neuen potenziellen Impfstoff gegen *Rhodococcus equi*-Infektionen bei foalen. ." *Tierärztl. Umschau* 67:394-400.

- Jain, Shruti, Barry R Bloom, et Mary K Hondalus. 2003. "Deletion of vapA encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*." *Molecular microbiology* 50 (1):115-128.
- Johnson, JA, JF Prescott, et RJF Markham. 1983. "The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intrabronchial challenge." *Veterinary pathology* 20 (4):440-449.
- Jones, Amanda L, Iain C Sutcliffe, et Michael Goodfellow. 2013. "Prescottiae equi gen. nov., comb. nov.: a new home for an old pathogen." *Antonie Van Leeuwenhoek, Journal of microbiology* 103 (3):655-671.
- Kanaly, S. T., S. A. Hines, et G. H. Palmer. 1993. "Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4+ T-lymphocyte-deficient transgenic mice." *Infection and Immunity* 61 (11):4929-32.
- Kasuga-Aoki, H, S Takai, Y Sasaki, S Tsubaki, H Madarame, et A Nakane. 1999. "Tumour necrosis factor and interferon- $\gamma$  are required in host resistance against virulent *Rhodococcus equi* infection in mice: cytokine production depends on the virulence levels of *R. equi*." *Immunology* 96 (1):122.
- Kasuga-Aoki, H., S. Takai, Y. Sasaki, S. Tsubaki, H. Madarame, et A. Nakane. 1999. "Tumour necrosis factor and interferon-gamma are required in host resistance against virulent *Rhodococcus equi* infection in mice: cytokine production depends on the virulence levels of *R. equi*." *Immunology* 96 (1):122-7.
- Kaur, Navjot, Hugh Townsend, Katharina Lohmann, Fernando Marques, et Baljit Singh. 2013. "Analyses of lipid rafts, Toll-like receptors 2 and 4, and cytokines in foals vaccinated with Virulence Associated Protein A/CpG oligonucleotide vaccine against *Rhodococcus equi*." *Veterinary immunology and immunopathology* 156 (3):182-189.
- Kenney, DG, SC Robbins, JF Prescott, A Kaushik, et JD Baird. 1994. "Development of reactive arthritis and resistance to erythromycin and rifampin in a foal during treatment for *Rhodococcus equi* pneumonia." *Equine veterinary journal* 26 (3):246-248.
- Kohn, CW, D Knight, W Hueston, R Jacobs, et SM Reed. 1989. "Colostrum and serum IgG, IgA, and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195 (1):64-68.
- Kohn, CW, R Sams, JJ Kowalski, J Powers, et S Wallace. 1993. "Pharmacokinetics of single intravenous and single and multiple dose oral administration of rifampin in mares." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 16 (2):119-131.
- Kuskie, Kyle R, Jacqueline L Smith, Samiran Sinha, Craig N Carter, Morgan K Chaffin, Nathan M Slovis, Stuart E Brown, Randolph S Stepusin, Shinji Takai, et Noah D Cohen. 2011. "Associations between the exposure to airborne virulent *Rhodococcus equi* and the incidence of *R. equi* pneumonia among individual foals." *Journal of equine veterinary science* 31 (8):463-469.
- Lakritz, Jeffrey, W David Wilson, Antoinette E Marsh, et Judy E Mihalyi. 2000. "Pharmacokinetics of erythromycin estolate and erythromycin phosphate after intragastric administration to healthy foals." *American journal of veterinary research* 61 (8):914-919.
- Leclere, Mathilde, K Gary Magdesian, Philip H Kass, Nicola Pusterla, et Diane M Rhodes. 2011. "Comparison of the clinical, microbiological, radiological and haematological features of foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi* and other bacteria." *The Veterinary Journal* 187 (1):109-112.

- Lee, Sujin, et Minh Trang Nguyen. 2015. "Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases." *Immune network* 15 (2):51-57.
- Letek, Michal, Patricia Gonzalez, Iain MacArthur, Héctor Rodríguez, Tom C Freeman, Ana Valero-Rello, Mónica Blanco, Tom Buckley, Inna Cherevach, et Ruth Fahey. 2010. "The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions." *PLoS genetics* 6 (9):e1001145.
- Letek, Michal, Alain A Ocampo-Sosa, Mandy Sanders, Ursula Fogarty, Tom Buckley, Desmond P Leadon, Patricia González, Mariela Scotti, Wim G Meijer, et Julian Parkhill. 2008. "Evolution of the *Rhodococcus equi* vap pathogenicity island seen through comparison of host-associated vapA and vapB virulence plasmids." *Journal of bacteriology* 190 (17):5797-5805.
- Lohmann, Katharina L, A Marianela Lopez, Stephen T Manning, Fernando J Marques, Robert Brownlie, Andrew L Allen, Anna E Sangster, George Mutwiri, Volker Gerds, et Andrew Potter. 2013. "Failure of a VapA/CpG oligodeoxynucleotide vaccine to protect foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia despite induction of VapA-specific antibody and interferon- $\gamma$  response." *Canadian Journal of Veterinary Research* 77 (3):161-169.
- Lopez, A Marianela, Melissa T Hines, Guy H Palmer, Debra C Alperin, et Stephen A Hines. 2002. "Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9 (6):1270-1276.
- Lopez, A Marianela, Melissa T Hines, Guy H Palmer, Donald P Knowles, Debra C Alperin, et Stephen A Hines. 2003. "Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the vapA gene of *Rhodococcus equi*." *Vaccine* 21 (25):3815-3825.
- Lopez, AM, HGG Townsend, AL Allen, et MK Hondalus. 2008. "Safety and immunogenicity of a live-attenuated auxotrophic candidate vaccine against the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*." *Vaccine* 26 (7):998-1009.
- Lührmann, Anja, Norman Mauder, Tobias Sydor, Eugenia Fernandez-Mora, Jan Schulze-Luehrmann, Shinji Takai, et Albert Haas. 2004. "Necrotic death of *Rhodococcus equi*-infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids." *Infection and immunity* 72 (2):853-862.
- MacArthur, Iain, Elisa Anastasi, Sonsiray Alvarez, Mariela Scotti, et José A Vázquez-Boland. 2017. "Comparative genomics of *Rhodococcus equi* virulence plasmids indicates host-driven evolution of the vap pathogenicity island." *Genome biology and evolution* 9 (5):1241-1247.
- Machang'u, RS, et JF Prescott. 1991. "Purification and properties of cholesterol oxidase and choline phosphohydrolase from *Rhodococcus equi*." *Canadian Journal of Veterinary Research* 55 (4):332.
- Madarame, H, S Takai, N Morisawa, M Fujii, D Hidaka, S Tsubaki, et Y Hasegawa. 1996. "Immunohistochemical detection of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* in pulmonary lesions of foals." *Veterinary pathology* 33 (3):341-343.
- Madigan, JE, S Hietala, et N Muller. 1991. "Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma." *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 44:571-578.
- Martens, RJ, ND Cohen, VR Fajt, JR Nerren, MK Chaffin, RJ Taylor, et LR Bernstein. 2010. "Gallium maltolate: safety in neonatal foals following multiple enteral

- administrations." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 33 (2):208-212.
- Martens, RJ, RA Fiske, et HW Renshaw. 1982. "Experimental subacute foal pneumonia induced by aerosol administration of *Corynebacterium equi*." *Equine veterinary journal* 14 (2):111-116.
- Martens, RJ, Judy G Martens, et RA Fiske. 1991. "Failure of passive immunisation by colostrum from immunised mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia." *Equine veterinary journal* 23 (S12):19-22.
- Martens, RJ, JUDY G MARTENS, RA Fiske, et SHARON K HIETALA. 1989. "Rhodococcus equi foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals." *Equine veterinary journal* 21 (4):249-255.
- Martens, Ronald J, Noah D Cohen, M Keith Chaffin, Shinji Takai, Charity L Doherty, Arthur B Angulo, et Ronnie F Edwards. 2002. "Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia in foals." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221 (6):825-833.
- Martens, Ronald J, Noah D Cohen, M Keith Chaffin, et Jeffery S Waskom. 2002. "Association of pneumonia in foals caused by *Rhodococcus equi* with farm soil geochemistry." *American journal of veterinary research* 63 (1):95-98.
- Martens, Ronald J, Noah D Cohen, Samuel L Jones, Thomas A Moore, et John F Edwards. 2005. "Protective role of neutrophils in mice experimentally infected with *Rhodococcus equi*." *Infection and immunity* 73 (10):7040-7042.
- Martens, Ronald J, Katrina Mealey, Noah D Cohen, Jessica R Harrington, M Keith Chaffin, Robert J Taylor, et Lawrence R Bernstein. 2007. "Pharmacokinetics of gallium maltolate after intragastric administration in neonatal foals." *American journal of veterinary research* 68 (10):1041-1044.
- Martens, Ronald J, Shinji Takai, Noah D Cohen, M Keith Chaffin, Hui Liu, Kimiko Sakurai, Hiromi Sugimoto, et Sonia W Lingsweiler. 2000. "Association of disease with isolation and virulence of *Rhodococcus equi* from farm soil and foals with pneumonia." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217 (2):220-225.
- McQueen, CM, SV Dindot, MJ Foster, et ND Cohen. 2015. "Genetic susceptibility to *Rhodococcus equi*." *Journal of veterinary internal medicine* 29 (6):1648-1659.
- McQueen, Cole M, Canaan M Whitfield-Cargile, Kranti Konganti, Glenn P Blodgett, Scott V Dindot, et Noah D Cohen. 2016. "TRPM2 SNP genotype previously associated with susceptibility to *Rhodococcus equi* pneumonia in Quarter Horse foals displays differential gene expression identified using RNA-Seq." *BMC genomics* 17 (1):993.
- Mealey, RH, DM Stone, MT Hines, DC Alperin, MH Littke, SR Leib, SE Leach, et SA Hines. 2007. "Experimental *Rhodococcus equi* and equine infectious anemia virus DNA vaccination in adult and neonatal horses: effect of IL-12, dose, and route." *Vaccine* 25 (43):7582-7597.
- Muller, Noel S, et JE Madigan. 1992. "Methods of implementation of an immunoprophylaxis program for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia: results of a 5-year field study." Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA).
- Muscatello, G, GA Anderson, JR Gilkerson, et GF Browning. 2006. "Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms." *Applied and environmental microbiology* 72 (9):6152-6160.

- Muscatello, G, S Gerbaud, C Kennedy, JR Gilkerson, T Buckley, M Klay, DP Leadon, et GF Browning. 2006. "Comparison of concentrations of *Rhodococcus equi* and virulent *R. equi* in air of stables and paddocks on horse breeding farms in a temperate climate." *Equine veterinary journal* 38 (3):263-265.
- Muscatello, G, JR Gilkerson, et GF Browning. 2009. "Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals." *Journal of clinical microbiology* 47 (3):734-737.
- Muscatello, Gary. 2012. "Rhodococcus equi pneumonia in the foal—part 2: diagnostics, treatment and disease management." *The Veterinary Journal* 192 (1):27-33.
- Nakazawa, Muneo, Yasuro Isayama, Mamoru Kashiwazaki, et Tadashi Yasui. 1987. "Diagnosis of *Rhodococcus equi* infection in foals by the agar gel diffusion test with protein antigen." *Veterinary microbiology* 15 (1-2):105-113.
- Nerren, Jessica R, Ronald J Martens, Susan Payne, Jennifer Murrell, Jamie L Butler, et Noah D Cohen. 2009. "Age-related changes in cytokine expression by neutrophils of foals stimulated with virulent *Rhodococcus equi* in vitro." *Veterinary immunology and immunopathology* 127 (3):212-219.
- Nordengrahn, A, M Rusvai, M Merza, J Ekström, B Morein, et S Belak. 1996. "Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes." *Veterinary microbiology* 51 (1-2):55-68.
- Nordmann, P, JJ Kerestedjian, et E Ronco. 1992. "Therapy of *Rhodococcus equi* disseminated infections in nude mice." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 36 (6):1244-1248.
- Nordmann, P., E. Ronco, et C. Nauciel. 1992. "Role of T-lymphocyte subsets in *Rhodococcus equi* infection." *Infection and Immunity* 60 (7):2748-52.
- Ocampo-Sosa, Alain A, Deborah A Lewis, Jesús Navas, Frances Quigley, Raquel Callejo, Mariela Scortti, Desmond P Leadon, Ursula Fogarty, et José A Vázquez-Boland. 2007. "Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on traA, vapA, and vapB virulence plasmid markers." *The Journal of infectious diseases* 196 (5):763-769.
- Paillot, R, JM Daly, V Juillard, JM Minke, D Hannant, et JH Kydd. 2005. "Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1." *Vaccine* 23 (36):4541-4551.
- Paillot, R, JH Kydd, S MacRae, JM Minke, D Hannant, et JM Daly. 2007. "New assays to measure equine influenza virus-specific Type 1 immunity in horses." *Vaccine* 25 (42):7385-7398.
- Paillot, R, E Sharp, R Case, et J Nugent. 2009. "Herpes virus infection in equid species." Dans *Herpesviridae: Viral Structure, Life Cycle and Infection.* , édité par T.R. Gluckman, 17-86. : Novasciences Publishers.
- Pargass, IS., Tamara B Wills, William C Davis, K Jane Wardrop, Debby C Alperin, et Stephen A Hines. 2009. "The influence of age and *Rhodococcus equi* infection on CD1 expression by equine antigen presenting cells." *Veterinary immunology and immunopathology* 130 (3):197-209.
- Pasquale, Alberta Di, Scott Preiss, Fernanda Tavares Da Silva, et Nathalie Garçon. 2015. "Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond." *Vaccines* 3 (2):320-343.
- Passamonti, F, DM Vardi, V Stefanetti, ML Marenzoni, S Prato, P Cévese, M Coletti, M Pepe, P Casagrande Proietti, et F Olea-Popelka. 2015. "Rhodococcus equi pneumonia in foals: An assessment of the early diagnostic value of serum amyloid

- A and plasma fibrinogen concentrations in equine clinical practice." *The Veterinary Journal* 203 (2):211-218.
- Patton, K. M., T. C. McGuire, D. G. Fraser, et S. A. Hines. 2004. "Rhodococcus equi-infected macrophages are recognized and killed by CD8+ T lymphocytes in a major histocompatibility complex class I-unrestricted fashion." *Infection and Immunity* 72 (12):7073-83. doi: 72/12/7073 [pii] 10.1128/IAI.72.12.7073-7083.2004.
- Patton, K. M., T. C. McGuire, M. T. Hines, R. H. Mealey, et S. A. Hines. 2005. "Rhodococcus equi-specific cytotoxic T lymphocytes in immune horses and development in asymptomatic foals." *Infection and Immunity* 73 (4):2083-93.
- Patton, Kristin M, Travis C McGuire, Melissa T Hines, Robert H Mealey, et Stephen A Hines. 2005. "Rhodococcus equi-specific cytotoxic T lymphocytes in immune horses and development in asymptomatic foals." *Infection and immunity* 73 (4):2083-2093.
- Pei, Yanlong, Chris Dupont, Tobias Sydor, Albert Haas, et John F Prescott. 2006. "Cholesterol oxidase (ChoE) is not important in the virulence of Rhodococcus equi." *Veterinary microbiology* 118 (3):240-246.
- Pei, Yanlong, Vivian Nicholson, Katharine Woods, et John F Prescott. 2007. "Immunization by intrabronchial administration to 1-week-old foals of an unmarked double gene disruption strain of Rhodococcus equi strain 103+." *Veterinary microbiology* 125 (1):100-110.
- Perkins, Gillian A, Amy Yeager, Hollis N Erb, Daryl Nydam, Thomas Divers, et James Bowman. 2002. "Survival of foals with experimentally induced Rhodococcus equi infection given either hyperimmune plasma containing R. equi antibody or normal equine plasma." *Vet Ther* 3334.
- Peters, Jette, Wiebke Block, Stefan Oswald, Johanna Freyer, Markus Grube, Heyo K Kroemer, Marc Lämmer, Dieter Lütjohann, Monica Venner, et Werner Siegmund. 2011. "Oral absorption of clarithromycin is nearly abolished by chronic comedication of rifampicin in foals." *Drug Metabolism and Disposition* 39 (9):1643-1649.
- Peters, Jette, Karen Eggers, Stefan Oswald, Wiebke Block, Dieter Lütjohann, Marc Lämmer, Monica Venner, et Werner Siegmund. 2012. "Clarithromycin is absorbed by an intestinal uptake mechanism that is sensitive to major inhibition by rifampicin: results of a short-term drug interaction study in foals." *Drug Metabolism and Disposition* 40 (3):522-528.
- Petrovsky, Nikolai, et Julio César Aguilar. 2004. "Vaccine adjuvants: current state and future trends." *Immunology and cell biology* 82 (5):488-496.
- Petry, S, C Sévin, MA Fleury, F Duquesne, N Foucher, C Laugier, M Henry-Amar, et J Tapprest. 2017. "Differential distribution of vapA-positive Rhodococcus equi in affected and unaffected horse-breeding farms." *Veterinary Record* 181 (6):145-145.
- Phumoonna, Tongted, G Muscatello, C Chicken, JR Gilkerson, GF Browning, MD Barton, et MW Heuzenroeder. 2006. "Clinical Evaluation of a Peptide-ELISA based upon N-terminal B-cell Epitope of the VapA Protein for Diagnosis of Rhodococcus equi Pneumonia in Foals." *Zoonoses and Public Health* 53 (3):126-132.
- Prescott, JF. 1987. "Epidemiology of Rhodococcus equi infection in horses." *Veterinary microbiology* 14 (3):211-214.

- Prescott, JF, R Coshan-Gauthier, et L Barksdale. 1984. "Antibody to equi factor (s) in the diagnosis of *Corynebacterium equi* pneumonia of foals." *Canadian journal of comparative medicine* 48 (4):370.
- Prescott, JF, AS Fernandez, VM Nicholson, MC Patterson, JA Yager, L Viel, et G Perkins. 1996. "Use of a virulence-associated protein based enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* serology in horses." *Equine veterinary journal* 28 (5):344-349.
- Prescott, JF, et VM Nicholson. 1984. "The effects of combinations of selected antibiotics on the growth of *Corynebacterium equi*." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 7 (1):61-64.
- Prescott, JF, VM Nicholson, MC Patterson, Meleiro MC Zandona, de Araujo A Caterino, JA Yager, et MA Holmes. 1997. "Use of *Rhodococcus equi* virulence-associated protein for immunization of foals against R equi pneumonia." *American journal of veterinary research* 58 (4):356-359.
- Prescott, JF, M Travers, et JA Yager-Johnson. 1984. "Epidemiological survey of *Corynebacterium equi* infections on five Ontario horse farms." *Canadian journal of comparative medicine* 48 (1):10.
- Prescott, JOHN F. 1991. "*Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen." *Clinical microbiology reviews* 4 (1):20-34.
- Prescott, John F, et Andrew M Hoffman. 1993. "*Rhodococcus equi*." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 9 (2):375-384.
- Prescott, John F, Robert Machang'u, Jacek Kwiecien, et Kathy Delaney. 1989. "Prevention of foal mortality due to *Rhodococcus equi* pneumonia on an endemically affected farm." *The Canadian Veterinary Journal* 30 (11):871.
- Pusterla, N, WD Wilson, S Mapes, et CM Leutenegger. 2007. "Diagnostic evaluation of real-time PCR in the detection of *Rhodococcus equi* in faeces and." *The Veterinary Record* 161:272-275.
- Rahman, M. T., L. L. Herron, V. Kapur, W. G. Meijer, B. A. Byrne, J. Ren, V. M. Nicholson, et J. F. Prescott. 2003. "Partial genome sequencing of *Rhodococcus equi* ATCC 33701." *Veterinary microbiology* 94 (2):143-158. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00100-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00100-7).
- Raidal, Sharanne L, Claudia McTaggart, et J Penhale. 2005. "Effect of withholding macromolecules on the duration of intestinal permeability to colostral IgG in foals." *Australian veterinary journal* 83 (1-2):78-81.
- Ramirez, Sammy, Guy D Lester, et Greg R Roberts. 2004. "Diagnostic contribution of thoracic ultrasonography in 17 foals with *Rhodococcus equi* pneumonia." *Veterinary Radiology & Ultrasound* 45 (2):172-176.
- Ren, Jun, et John F Prescott. 2003. "Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701." *Veterinary microbiology* 94 (2):167-182.
- Reuss, SM. 2016. "Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infections." *Equine Veterinary Education* 28 (4):193-195.
- Rocha, Joana N, Noah D Cohen, Angela I Bordin, Courtney N Brake, Steeve Giguère, Michelle C Coleman, Robert C Alaniz, Sara D Lawhon, Waithaka Mwangi, et Suresh D Pillai. 2016. "Oral Administration of Electron-Beam Inactivated *Rhodococcus equi* Failed to Protect Foals against Intrabronchial Infection with Live, Virulent R. equi." *PLoS one* 11 (2):e0148111.

- Ryan, C., S. Giguere, J. Hagen, C. Hartnett, et A. E. Kalyuzhny. 2010. "Effect of age and mitogen on the frequency of interleukin-4 and interferon gamma secreting cells in foals and adult horses as assessed by an equine-specific ELISPOT assay." *Vet Immunol Immunopathol* 133 (1):66-71. doi: S0165-2427(09)00208-6 [pii] 10.1016/j.vetimm.2009.06.010.
- Sanz, M, A Loynachan, L Sun, A Oliveira, P Breheny, et DW Horohov. 2013. "The effect of bacterial dose and foal age at challenge on *Rhodococcus equi* infection." *Veterinary microbiology* 167 (3):623-631.
- Sanz, MG, AF Oliveira, A Loynachan, A Page, V Svansson, S Giguère, et DW Horohov. 2016. "Validation and evaluation of VapA-specific IgG and IgG subclass enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to identify foals with *Rhodococcus equi* pneumonia." *Equine veterinary journal* 48 (1):103-108.
- Sanz, MG, AF Oliveira, A Page, et DW Horohov. 2014. "Administration of commercial *Rhodococcus equi* specific hyperimmune plasma results in variable amounts of IgG against pathogenic bacteria in foals." *The Veterinary Record* 175.
- Sanz, MG, N Villarino, A Ferreira-Oliveira, et DW Horohov. 2015. "VapA-specific IgG and IgG subclasses responses after natural infection and experimental challenge of foals with *Rhodococcus equi*." *Veterinary immunology and immunopathology* 164 (1):10-15.
- Scheuch, Eberhard, Janina Spieker, Monica Venner, et Werner Siegmund. 2007. "Quantitative determination of the macrolide antibiotic tulathromycin in plasma and broncho-alveolar cells of foals using tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* 850 (1):464-470.
- Sellon, Debra C, Thomas E Besser, Sally L Vivrette, et Rebecca S McConnico. 2001. "Comparison of Nucleic Acid Amplification, Serology, and Microbiologic Culture for Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals." *Journal of clinical microbiology* 39 (4):1289-1293.
- Skalka, B, et A Švastová. 1985. "Two techniques for detection of antibodies against *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* in horse sera." *Veterinary microbiology* 10 (3):293-300.
- Slovis, NM, JL McCracken, et G Mundy. 2005. "How to use thoracic ultrasound to screen foals for *Rhodococcus equi* at affected farms." Proceedings of the 51st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Seattle, Washington, USA, 3-7 December, 2005.
- Sokolovska, Anna, Stanley L Hem, et Harm HogenEsch. 2007. "Activation of dendritic cells and induction of CD4+ T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants." *Vaccine* 25 (23):4575-4585.
- Sönmez, K, et A Gürel. 2013. "Histopathological alterations and immunohistochemistry in tissue samples from horses suspected of *Rhodococcus equi* infection." *Revue Méd. Vét* 164 (2):80-84.
- Sönmez, K, A Gürel, et S Takai. 2011. "Immunocytochemical detection of *Rhodococcus equi* in tracheal washes of foals." *Journal of comparative pathology* 145 (1):6-11.
- Stephenson, J.R. 2015. Recombinant vapa and vpc peptides and uses thereof. : Google Patents.
- Stieler, AL, LC Sanchez, MF Mallicote, BB Martabano, JA Burrow, et RJ MacKay. 2016. "Macrolide-induced hyperthermia in foals: Role of impaired sweat responses." *Equine veterinary journal* 48 (5):590-594.

- Stieler Stewart, AL, LC Sanchez, MF Mallicote, AL Muniz, MS Westerterp, JA Burrow, et RJ MacKAY. 2017. "Effects of clarithromycin, azithromycin and rifampicin on terbutaline-induced sweating in foals." *Equine veterinary journal*.
- Stoughton, William, Toni Poole, Kyle Kuskie, Mei Liu, Kim Bishop, Audrey Morrissey, Shinji Takai, et Noah Cohen. 2013. "Transfer of the Virulence-Associated Protein A-Bearing Plasmid between Field Strains of Virulent and Avirulent *Rhodococcus equi*." *Journal of veterinary internal medicine* 27 (6):1555-1562.
- Stratton-Phelps, Meri, W David Wilson, et Ian A Gardner. 2000. "Risk of adverse effects in pneumonic foals treated with erythromycin versus other antibiotics: 143 cases (1986–1996)." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217 (1):68-73.
- Suarez-Mier, G, S Giguere, et EA Lee. 2007. "Pulmonary disposition of erythromycin, azithromycin, and clarithromycin in foals." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 30 (2):109-115.
- Sweeney, CR, RW Sweeney, et TJ Divers. 1987. "Rhodococcus equi pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy." *Veterinary microbiology* 14 (3):329-336.
- Sydor, Tobias, Kristine Borgen, Fong-Fu Hsu, Gitta Huth, Otto Holst, Jens Wohlmann, Ulrike Becken, Tobias Dykstra, Kristina Söhl, et Buko Lindner. 2013. "Diversion of phagosome trafficking by pathogenic *Rhodococcus equi* depends on mycolic acid chain length." *Cellular microbiology* 15 (3):458-473.
- Takai, S, T Fujimori, K Katsuzaki, et S Tsubaki. 1987. "Ecology of *Rhodococcus equi* in horses and their environment on horse-breeding farms." *Veterinary microbiology* 14 (3):233-239.
- Takai, S, Marijke M Henton, JA Picard, et AJ Guthrie. 2001. "Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil collected from two horse farms in South Africa and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids." *The Onderstepoort journal of veterinary research* 68 (2):105.
- Takai, S, S Kawazu, et S Tsubaki. 1985. "Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* infection in foals." *American journal of veterinary research* 46 (10):2166-2170.
- Takai, S, S Ohbushi, K Koike, S Tsubaki, H Oishi, et M Kamada. 1991. "Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections." *Journal of clinical microbiology* 29 (12):2887-2889.
- Takai, S, T Sekizaki, T Ozawa, T Sugawara, Y Watanabe, et S Tsubaki. 1991. "Association between a large plasmid and 15-to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*." *Infection and immunity* 59 (11):4056-4060.
- Takai, Shinji. 1997. "Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review." *Veterinary microbiology* 56 (3):167-176.
- Takai, Shinji, M Keith Chaffin, Noah D Cohen, Michiyo Hara, Mutsu Nakamura, Tsutomu Kakuda, Yukako Sasaki, Shiro Tsubaki, et Ronald J Martens. 2001. "Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas." *Journal of veterinary diagnostic investigation* 13 (6):489-494.
- Takai, SHINJI, M lie, CHIEKO Kobayashi, T Morishita, T Nishio, T Ishida, T Fujimura, Y Sasaki, et S Tsubaki. 1993. "Monoclonal antibody specific to virulence-associated

- 15-to 17-kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*." *Journal of clinical microbiology* 31 (10):2780-2782.
- Takai, Shinji, M Iie, Y Watanabe, S Tsubaki, et T Sekizaki. 1992. "Virulence-associated 15-to 17-kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens." *Infection and immunity* 60 (7):2995-2997.
- Takai, SHINJI, SHINICHIRO Kawazu, et SHIRO Tsubaki. 1986. "Immunoglobulin and specific antibody responses to *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi* infection in foals as measured by enzyme-linked immunosorbent assay." *Journal of clinical microbiology* 23 (5):943-947.
- Takai, Shinji, Shinichiro Kawazu, et Shiro Tsubaki. 1987. "Humoral immune response of foals to experimental infection with *Rhodococcus equi*." *Veterinary microbiology* 14 (3):321-327.
- Takai, Shinji, Hisashi Kitajima, Yoshihiro Tamada, Susumu Matsukura, Yasuo Ohwa, Takanori Inui, Masakatu Kato, Noboru Seno, Shiro Tsubaki, et Tohru Anzai. 1995. "Humoral antibody response to the antigens of virulent *Rhodococcus equi* in foals." *Journal of Equine Science* 5 (4):121-126.
- Takai, Shinji, Izumi Nakata, Naoto Fujii, Yoshinori Kimura, Yukako Sasaki, Tsutomu Kakuda, Shiro Tsubaki, Takashi Kondo, et Takeo Sugiura. 2002. "Isotype-specific antibody responses to *Rhodococcus equi* in foals on a horse-breeding farm with a persistent incidence of *R. equi* infection." *Journal of Equine Science* 13 (2):63-70.
- Takai, Shinji, Masato Shoda, Yukako Sasaki, Shiro Tsubaki, Guillaume Fortier, Stephane Pronost, Karim Rahal, Teotimo Becu, Angela Begg, et Glenn Browning. 1999. "Restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in *Rhodococcus equi*." *Journal of clinical microbiology* 37 (10):3417-3420.
- Takai, Shinji, Kazuyo Takeda, Yoshimi Nakano, Tetsuya Karasawa, Juichi Furugoori, Yukako Sasaki, Shiro Tsubaki, Tohru Higuchi, Tohru Anzai, et Ryuichi Wada. 1997. "Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* in an infected foal." *Journal of clinical microbiology* 35 (7):1904-1908.
- Tan, C, JF Prescott, MC Patterson, et VM Nicholson. 1995. "Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity." *Canadian Journal of Veterinary Research* 59 (1):51.
- Taouji, Saijū d, Emmanuel Bréard, Alexis Peyret-Lacombe, Stéphane Pronost, Guillaume Fortier, et Claire Collobert-Laugier. 2002. "Serum and mucosal antibodies of infected foals recognized two distinct epitopes of VapA of *Rhodococcus equi*." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 34 (4):299-306.
- Tapprest, J, C Laugier, C Mauger, N Foucher, C Sévin, et K Maillard. 2008. "Retrospective study of rhodococcosis from a population of 1352 autopsied foals." 4th *Rhodococcus equi* Havemeyer workshop. Edinburgh, United Kingdom.
- Tapprest, J, C Laugier, C Sévin, N Foucher, F Duquesne, et M Henry-Amar. 2011. "Pulmonary rhodococcosis in foals: risk factors related to horse husbandry in France." *REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE* 162 (12):563-573.
- Tapprest, Jackie, L Ziemniak, A Saison, D Courtois, F Duquesne, Claire Laugier, et Henry-Amar M. 2006. "Etude épidémiologique de la rhodococcosse du poulain en Basse-Normandie : résultats préliminaires." 32ème Journée de la Recherche Equine, Paris.
- Tirosh-Levy, Sharon, Sevil E Gürbilek, Osman Y Tel, Oktay Keskin, et Amir Steinman. 2017. "Seroprevalence of *Rhodococcus equi* in horses in Israel." *Journal of the South African Veterinary Association* 88 (1):1-6.

- Tripathi, VN, WC Harding, JM Willingham-Lane, et MK Hondalus. 2012. "Conjugal transfer of a virulence plasmid in the opportunistic intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*." *Journal of bacteriology* 194 (24):6790-6801.
- Valero-Rello, Ana, Alexia Hapeshi, Elisa Anastasi, Sonsiray Alvarez, Mariela Scotti, Wim G Meijer, Iain MacArthur, et José A Vázquez-Boland. 2015. "An invertron-like linear plasmid mediates intracellular survival and virulence in bovine isolates of *Rhodococcus equi*." *Infection and immunity* 83 (7):2725-2737.
- Van der Geize, R, AWF Grommen, GI Hessels, AAC Jacobs, et Lubbert Dijkhuizen. 2011. "The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* is important for pathogenesis and a target for vaccine development." *PLoS Pathogens* 7 (8):e1002181.
- Vanniasinkam, Thiru, Mary D Barton, et Michael W Heuzenroeder. 2001. "B-Cell Epitope Mapping of the VapA Protein of *Rhodococcus equi*: Implications for Early Detection of *R. equi* Disease in Foals." *Journal of clinical microbiology* 39 (4):1633-1637.
- Varga, J, L Fodor, M Rusvai, I Soos, et L Makrai. 1997. "Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines." *Veterinary microbiology* 56 (3):205-212.
- Vázquez-Boland, José A, Steeve Giguère, Alexia Hapeshi, Iain MacArthur, Elisa Anastasi, et Ana Valero-Rello. 2013. "*Rhodococcus equi*: the many facets of a pathogenic actinomycete." *Veterinary microbiology* 167 (1):9-33.
- Venner, M, K Astheimer, M Lämmer, et S Giguère. 2013. "Efficacy of mass antimicrobial treatment of foals with subclinical pulmonary abscesses associated with *Rhodococcus equi*." *Journal of veterinary internal medicine* 27 (1):171-176.
- Venner, M, N Credner, M Lämmer, et S Giguère. 2013. "Comparison of tulathromycin, azithromycin and azithromycin-rifampin for the treatment of mild pneumonia associated with *Rhodococcus equi*." *The Veterinary Record* 173 (16):397-397.
- Venner, M, B Meyer-Hamme, J Verspohl, F Hatori, N Shimizu, Y Sasaki, T Kakuda, S Tsubaki, et S Takai. 2007. "Genotypic characterization of VapA positive *Rhodococcus equi* in foals with pulmonary affection and their soil environment on a warmblood horse breeding farm in Germany." *Research in veterinary science* 83 (3):311-317.
- Venner, Monica, Anne Rödiger, Marc Laemmer, et Steeve Giguère. 2012. "Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing of subclinical pulmonary abscesses on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus equi*." *The Veterinary Journal* 192 (3):293-298.
- Vivrette, Sally. 2001. "Colostrum and oral immunoglobulin therapy in newborn foals." *COMPENDIUM ON CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTISING VETERINARIAN-NORTH AMERICAN EDITION*- 23 (3):286-291.
- Vivrette, SL, A Bostian, E Bermingham, et MG Papich. 2001. "Quinolone-induced arthropathy in neonatal foals." *Proc Am Assoc Equine Pract*.
- Von Bargaen, Kristine, et Albert Haas. 2009. "Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*." *FEMS microbiology reviews* 33 (5):870-891.
- von Bargaen, Kristine, Marco Polidori, Ulrike Becken, Gitta Huth, John F Prescott, et Albert Haas. 2009. "*Rhodococcus equi* virulence-associated protein A is required for diversion of phagosome biogenesis but not for cytotoxicity." *Infection and immunity* 77 (12):5676-5681.
- Wagner, B., A. Burton, et D. Ainsworth. 2010. "Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1

- cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals." *Veterinary Research* 41 (4):47. doi: 10.1051/vetres/2010019v09611 [pii].
- Whitfield-Cargile, Canaan M, Noah D Cohen, Jan Suchodolski, M Keith Chaffin, Cole M McQueen, Carolyn E Arnold, Scot E Dowd, et Glenn P Blodgett. 2015. "Composition and Diversity of the Fecal Microbiome and Inferred Fecal Metagenome Does Not Predict Subsequent Pneumonia Caused by *Rhodococcus equi* in Foals." *PLoS one* 10 (8):e0136586.
- Witkowski, Lucjan, Jarosław Kaba, Magdalena Rzewuska, Mariusz Nowicki, Olga Szaluś-Jordanow, et Jerzy Kita. 2012. "Development of ELISA test for determination of the level of antibodies against *Rhodococcus equi* in equine serum and colostrum." *Veterinary immunology and immunopathology* 149 (3):280-285.
- Womble, A, S Giguere, et EA Lee. 2007. "Pharmacokinetics of oral doxycycline and concentrations in body fluids and bronchoalveolar cells of foals." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 30 (3):187-193.
- Womble, A, S Giguère, YVSN Murthy, C Cox, et E Obare. 2006. "Pulmonary disposition of tilmicosin in foals and in vitro activity against *Rhodococcus equi* and other common equine bacterial pathogens." *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 29 (6):561-568.
- Yager, JA. 1987. "The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals." *Veterinary microbiology* 14 (3):225-232.
- Zink, MC, JA Yager, JF Prescott, et BN Wilkie. 1985. "In vitro phagocytosis and killing of *Corynebacterium equi* by alveolar macrophages of foals." *American journal of veterinary research* 46 (10):2171-2174.

## ANNEXE 1

### Présentation des intervenants

**PRÉAMBULE :** Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

#### RAPPORTEURS

---

M. Jean-Pierre GANIÈRE - ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses.

Mme Claire LAUGIER - Anses Dozulé puis CGAAER – Compétences en pathologie équine, diagnostic de laboratoire.

M. Romain PAILLOT – Animal Health Trust, New Market (UK) puis Labéo (F) – Compétences en immunologie équine.

Mme Valérie PICANDET – Cabinet vétérinaire – Compétences en médecine interne des équidés.

#### COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ SANTE ET BIEN-ETRE DES ANIMAUX

---

Les travaux, objets du présent rapport, ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES SABA du 8 mars 2018

##### Président

M. Etienne THIRY – Faculté de médecine vétérinaire de Liège (BE) – Compétences en virologie, immunologie.

##### Membres

Mme Suzanne BASTIAN – ONIRIS Nantes – Compétences en épidémiologie, bactériologie, parasitologie.

Mme Catherine BELLOC - ONIRIS Nantes – Compétences en Médecine des animaux d'élevage, monogastriques.

M. Alain BOISSY – INRA – Compétences en éthologie, bien-être animal, ruminants, zootechnie.

M. Jordi CASAL - Universitat Autònoma de Barcelona (ES) – Compétences en zoonose, épidémiologie quantitative, maladies animales exotiques, analyse quantitative des risques.

M. Christophe CHARTIER – ONIRIS Nantes – Compétences en parasitologie, pathologie des petits ruminants, technique d'élevage, épidémiologie.

M. Eric COLLIN – Vétérinaire praticien – Compétences en pathologie des ruminants.

M. Frédéric DELBAC – CNRS – Compétences en abeilles, épidémiologie, parasitologie, microbiologie.

Mme Barbara DUFOUR – ENV Alfort – Compétences en épidémiologie, maladies infectieuses, pathologie des ruminants.

M. Guillaume FOURNIÉ - Royal Veterinary College (UK) – Compétences en évaluation des risques quantitative et qualitative, modélisation, épidémiologie.

M. Jean-Pierre GANIÈRE – ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses, réglementation, zoonoses.

- M. Dominique GAUTHIER - Laboratoire départemental 05 – Compétences en faune sauvage, lagomorphes, méthodes de diagnostic.
- M. Etienne GIRAUD – INRA – Compétences en antibiorésistance, environnement, approche globale de la santé animale.
- M. Jacques GODFROID - Université Arctique de Norvège (NO) – Compétences en évaluation des risques, zoonose, épidémiologie, tuberculose, bactériologie, faune sauvage marine.
- M. Jean-Luc GUÉRIN – ENVT – Compétences en pathologie des volailles et lagomorphes, immunologie, virologie, zoonose et santé publique.
- M. Jean GUILLOTIN – Laboratoire départemental 59 – Généraliste, compétences en méthodes de diagnostic, porcs, faune sauvage.
- Mme Nadia HADDAD – Anses UMR BIPAR, ENV Alfort – Compétences en microbiologie, épidémiologie, maladies contagieuses.
- M. Jean HARS – Office national de la chasse et de la faune sauvage – Compétences en pathologie de la faune sauvage libre, épidémiologie.
- Mme Véronique JESTIN – Ex-directrice de recherche et ex-responsable d'unité et du Laboratoire National de Référence Influenza aviaire, Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané - virologie, infectiologie, pathologie aviaire, vaccinologie, méthodes de diagnostic, analyse de risque.
- Mme Elsa JOURDAIN – INRA – Compétences en zoonoses, épidémiologie quantitative, faune sauvage.
- Mme Claire LAUGIER – CGAAER – Compétences en pathologie équine, diagnostic de laboratoire.
- Mme Monique L'HOSTIS – Ex-Professeur à Oniris – Généraliste, compétences en parasitologie, abeilles, faune sauvage.
- Mme Coralie LUPO – IFREMER – Compétences en épidémiologie, pathologies aviaire et aquacole.
- M. Gilles MEYER – ENV Toulouse – Compétences en pathologie des ruminants, virologie.
- M. Pierre MORMÈDE – INRA Toulouse – Compétences en génétique du stress, endocrinologie, bien-être animal.
- Mme Carine PARAUD – Anses – Compétences en statistiques, pathologie des petits ruminants, parasitologie de terrain.
- Mme Claire PONSART – Anses – Compétences en épidémiologie, bactériologie, statistiques, virologie, pathologie de la reproduction.
- Mme Nathalie RUVOEN – ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses, zoonoses, réglementation
- M. Claude SAEGERMAN – Faculté de médecine vétérinaire de Liège – Compétences en épidémiologie, maladies contagieuses, maladies émergentes.
- M. Stéphan ZIENTARA – Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort – Compétences en virologie.

## **PARTICIPATION ANSES**

---

### **Contribution scientifique**

M. Jean-Claude ROUBY, ANMV,

### **Coordination scientifique**

Mme Charlotte DUNOYER, cheffe de l'unité Evaluation des risques liés à la Santé, à l'Alimentation et au Bien-être des animaux, Anses

**Secrétariat administratif**

M. Régis MOLINET – Anses

**AUDITION DE PERSONNALITES EXTERIEURES**

---

**Institut Français du Cheval et de l'Équitation**

Mme Bénédicte FERRY

**Laboratoire CEVA**

M. Laurent DROUET

M. Alain SCHRUMPF

M. Eric THIBAUT

**Laboratoire FILAVIE**

M. Dominique FOURNIE

**Professionnels de l'élevage équin**

M. Alain CHOPARD, Haras des Faunes, Gironde

M. Pierre JULIENNE, éleveur en Normandie

M. Pascal NOUE, étalonnier-éleveur en Normandie

Dr Roger-Yves SIMON vétérinaire et étalonnier-éleveur en Loire Atlantique.

ANNEXE 2 : DETAILS DES ETUDES VACCINALES CHEZ L'ESPECE CIBLE

1. Vaccin vivant atténué :

- **Chirino-Trejo et al, Canadian Journal of Veterinary Research, 1987** (Chirino-Trejo, Prescott, et Yager 1987): 3 groupes de 3 poulains chacun (âgés d'1 à 3 semaines) vaccinés oralement avec une souche clinique de *R. equi* (souche 2325-85, 3 passages en culture) ou la même souche après 100 passages en culture. Un groupe contrôle. Quatre immunisations parentérales (V1 et rappel en semaines 2, 3 et 4). Challenge 3 semaines après la dernière immunisation (infection par nébulisation individuelle, dose de  $1.2 \times 10^{10}$  CFU, jours 0, 1, 2, 6 et 7). Sévère forme clinique de la maladie dans le groupe contrôle. Réduction des signes cliniques et de la charge bactérienne pulmonaire dans les groupes vaccinés.
- **Martens et al, Equine Veterinary Journal, 1991** (Martens, Martens, et Fiske 1991) : Immunisation des juments gravides (3 à 5 administrations) avec une suspension saline contenant une souche vivante de *R. equi* (groupe 1, 6 juments). Souche d'origine clinique non-atténuée (Martens *et al.* 1989). Groupe contrôle (6 juments non vaccinées). Infection expérimentale par *R. equi* des poulains issus des juments vaccinées ou non (infection 7 jours après la naissance). Pas de différences au niveau de la protection (taux de survie des poulains, 2/6 pour le groupe 1 vacciné et 2/6 pour le groupe contrôle).
- **Hooper-McGrevy et al, Vaccine, 2005** (Hooper-McGrevy, Wilkie, et Prescott 2005) : vaccin contenant la souche vivante ATCC 33701 administrée oralement à un âge de 2,7 et 14 jours. Groupe 1 = 4 poulains immunisés, groupe 2 = 3 poulains contrôles. Challenge intra-bronchial 1 semaine après la dernière immunisation avec la souche ATCC 33701 virulente. Forme clinique de la maladie chez le groupe contrôle, pas de signes cliniques dans le groupe vacciné. Stimulation d'une réponse sérologique anti VapA et VapC chez les poulains immunisés.
- **Pei et al, Veterinary Microbiology, 2006** (Pei *et al.* 2006) : évaluation d'une souche *R. equi* 103+ mutante (délétion du gène *choE* codant pour la cholesterol oxidase) chez le poulain et comparaison avec la souche parentale. Pas de différence de virulence avec la souche parentale.
- **Pei et al, Veterinary Microbiology, 2007** (Pei *et al.* 2007) : vaccin vivant atténué, souche *R. equi* 103+ (mutant *choE* et *icl*, isocytate lyase). Immunisation intra-bronchiale de 5 poulains âgés d'une semaine et challenge infectieux intra-bronchial avec la souche parentale 2 semaines plus tard. Trois poulains protégés mais les 2 autres poulains ont développé une pneumonie associée à la souche vaccinale.
- **Lopez et al, Vaccine 2008** (Lopez *et al.* 2008) : souche *R. equi* vivante atténuée (mutant riboflavin auxotrophique), administration pulmonaire par endoscopie, vaccin immunogénique chez le poulain mais n'a pas conféré de protection dans le cadre d'un challenge infectieux.
- **Van der Geize et al, PlosPathogens, 2011** (Van der Geize *et al.* 2011) : souche vivante atténuée (RE1 $\Delta$ *pdAB*-; sous-unité alpha de la coenzyme A transférase). Deux immunisations orales chez le jeune poulain (2 à 4 semaines d'âge, V1 et V2, séparées de 2 semaines) et challenge infectieux (inoculation intra-trachéale avec une souche virulente 85F, 2 semaines après V2). Groupe 1 = 4 poulains immunisés, groupe 2 = 4 poulains contrôles non immunisés. 2 poulains affectés dans le groupe 1 (signes cliniques limités). Signes cliniques sévères chez tous les poulains du groupe contrôle (euthanasie 14 jours après infection expérimentale).
- **Jacobs et al, Tierärztl. Umschau 2012 (article en Allemand, Intervet International)** (Jacobs *et al.* 2012) : cet article rapporte l'utilisation d'une souche mutante  $\Delta$ *ipdABipdAB2* (double mutation, souche RG2837) présentant un défaut de survie intracellulaire, comme candidat vaccinal. Deux études sont présentées, une première impliquant la vaccination orale de poulain d'une semaine (1 à 2 immunisations) avec un challenge intra-tracheale 3 semaines après la dernière immunisation. Niveau de protection inconsistant mais indication d'une corrélation avec le taux d'anticorps anti VapA. Second essai avec vaccination intra-rectale

(poulains âgés de 5 mois) et un niveau de protection amélioré. Troisième essai avec immunisation intra-rectale de poulain âgés d'une semaine (1 immunisation sur 2 jours), challenge infectieux 3 semaines plus tard (voie orale ou rectale). Protection significative observée. Des résultats complémentaires sont disponibles dans un brevet d'invention (référence EP2385836B1) : 16 poulains (âge compris entre 2 et 4 semaines), 4 groupes de 4 poulains. 3 groupes : Vaccination orale (1ml avec RE1 $\Delta$ ipdAB, 5°09 à 5°07 CFU) et un groupe contrôle non vacciné. V1 et V2, séparées de 2 semaines. Challenge infectieux à 4 semaines (voie intra-trachéale, souche 85F). Tous les poulains du groupe contrôle ont développé une forme sévère de la maladie. 2 poulains vaccinés ont présenté des signes cliniques équivalant à ceux du groupe contrôle. Les autres poulains vaccinés ont développé une forme « légère » de la maladie. Les résultats fournis sont limités. Pas d'effet dose réponse.

## 2. Vaccin complet inactivé :

- **Varga et al, Veterinary Microbiology, 1997** (Varga *et al.* 1997) : deux vaccins inactivés (inactivation chimique), 1 vaccin combinant *R. equi* et EHV-2 et un vaccin *R. equi* seul, adjuvantés avec des sels d'aluminium. Vaccination des juments gravides 6 et 2 semaines avant mise bas, immunisation des poulains 3, 5 et 7 semaines après la naissance. Mesure de l'impact de la vaccination sur le taux de prévalence naturel de rhodococcose. Elevages A et B (24 poulains vaccinés avec combo-vaccin, 14 poulains vaccinés avec le vaccin monovalent et 12 contrôles), aucun cas chez les poulains immunisés, 2 cas de rhodococcose et 4 cas d'infection respiratoire chez les poulains contrôles. Elevage C, 15 poulains vaccinés avec le vaccin monovalent, aucun cas de rhodococcose observé, 11 poulains contrôles avec 2 cas de rhodococcose. Faible immunogénicité des vaccins utilisés.
- **Bordin et al, PlosOne 2014** (Bordin *et al.* 2014) : première tentative d'immunisation avec une souche *R. equi* inactivé par radiation (*R. equi* eBeam) avec ou sans la toxine cholérique (sous unité B) comme adjuvant. Administration par voie entérale à un âge de 2, 9, 16 et 23 jours. 4 groupes, groupe 1 (n=9) et 2 (n=10) immunisés avec des doses décroissantes de *R. equi* eBeam (2<sup>e</sup>10 et 1<sup>e</sup>11 CFU, respectivement), groupe 3 = poulains contrôles (n=9, saline) et groupe 4 (n=6) administré avec une souche virulente de *R. equi*. Des réponses immunitaires mucosale et à médiation cellulaire ont été mesurées chez les groupes vaccinés. Pas de challenge infectieux.
- **Rocha et al, PlosOne 2016** (Rocha *et al.* 2016) : souche vaccinale de *R. equi* inactivé par radiation (*R. equi* eBeam) et adjuvanté avec la toxine cholérique (sous unité B). 8 poulains vaccinés par gavage orale à 2, 7 et 14 jours après la naissance. 4 poulains contrôles non vaccinés. Challenge infectieux au 21<sup>ème</sup> jour. Le vaccin semble avoir été peu immunogénique. Les taux de protection contre le développement de pneumonie sont limités et identiques entre les 2 groupes (12% et 25% pour les groupes vacciné et control, respectivement). Vaccin peu immunogénique.

## 3. Vaccin sous-unitaire :

- **Prescott et al, Am. J. Vet. Res. 1997** (Prescott *et al.* 1997) : immunisation intramusculaire avec un vaccin protéique VapA APTX (protéine associée au plasmide de virulence extrait par Tryton X). Groupe 1 (vacciné) = 8 juments gravides et poulains, groupe 2 (contrôle) = 6 juments gravides et poulains. La vaccination des juments (2 immunisations) et poulains (2 immunisations à un âge de 3 et 5 semaines) avec Vap n'a pas induit de protection mais pourrait avoir entraîné une exacerbation des signes cliniques de la maladie, 4 cas de rhodococcose dans le groupe vacciné, 1 cas dans le groupe contrôle.
- **Bécu et al, Veterinary Microbiology, 1997** (Becu, Polledo, et Gaskin 1997) : étude terrain de grande ampleur en Argentine. Vaccin sous-unitaire contenant des antigènes solubles de *R. equi* (dont VapA). 3 études terrains :

- Etude terrain 1 : entre 700 et 1200 juments vaccinées 45, 30 et 15 jours avant la parturition, ou 30 et 15 jours seulement. Pas de vaccination des poulains. Mortalité des poulains associée à *R. equi* réduite de 3% à 1.2%.
- Etude terrain 2 : vaccination des juments gravides identique à l'étude terrain 1, les poulains (n=380) ont reçu de l'HIP à un âge de 4 ou 25 jours. Mortalité des poulains associée à *R. equi* réduite de 5.8% à 0.2%.
- Etude terrain 3 : groupe 1 = 33 poulains issues de juments vaccinées, apport d'HIP (à un âge de 4 ou 25 jours). Groupe 2 = 10 poulains issues de juments vaccinées, pas d'HIP mais vaccination à l'âge de 20, 30 et 40 jours. Groupe 3 = 10 poulains issus de juments non-vaccinées, pas d'HIP, pas d'immunisation. Pas de protection contre la mortalité induite par *R. equi*.
- **Cauchard et al, Veterinary Microbiology, 2004** (Cauchard *et al.* 2004) : 3 groupes. Groupe 1 = 24 juments gravides immunisées avec un vaccin protéique (solution purifiée contenant VapA) adjuvanté par une solution aqueuse nanoparticulaire (Montanide IMS 3012). Groupe 2 = 8 juments gravides immunisées avec un vaccin complet inactivé et groupe 3 contrôle = 16 juments gravides non immunisées. Suivie des poulains sur une période de 6 mois après la naissance ; aucun cas dans les groupes 1 et 2, 4 cas dans le groupe 3.
- **Cauchard et al, Int. J. Med. Microbiol., 2006** (Cauchard *et al.* 2006) : vaccin peptidique (4 peptides VapA de la souche *R. equi* ATCC 33701) adjuvanté par une solution aqueuse nanoparticulaire (Montanide IMS 3012), immunisation intramusculaire. Les résultats démontrent l'immunogénicité de ce vaccin chez le poulain par la mise en évidence d'une réponse humorale.
- **Cauchard et al, Veterinary Immunology & Immunopathology, 2014** (Cauchard *et al.* 2014) : 12 poulains (âgés de 3 semaines). Immunisation avec un cocktail de protéines sécrétées (ResP : *R. equi* secreted proteins incluant la cholesterol oxidase, mycolyl transferase 3, et PSP (probable secreted protein)) adjuvanté avec la solution aqueuse nanoparticulaire (Montanide IMS 3012) ou un adjuvant polymérique (Montanide PET GEL A). Test d'innocuité avec réaction inflammatoire augmentée pour le vaccin ResP/PET. Immunogénicité mise en évidence par la mesure de la réponse immunitaire humorale (profil IgGa). Pas de donnée concernant la protection.
- **Stephenson J. Brevet d'invention (US 2015/0023983 A1)** (Stephenson 2015) :
  - Etude 1/2012: 31 juments gravides immunisées avec un vaccin VapAVapC, VapA ou VapC (vaccin sous-unitaire) :
    - ✓ groupe 1 : 10 juments gravides (7-9 mois de gestation), immunisation VapAVapC. Rappel 2 semaines après vaccination initiale. Second rappel effectué dans le mois précédant la mise bas. 2 juments ont reçu le rappel dans les 2 mois précédant la mise bas.
    - ✓ groupe 2 : 11 juments gravides immunisées avec un vaccin VapA, planning de vaccination de vaccination identique au groupe 1.
    - ✓ groupe 3 : 10 juments gravides immunisées avec un vaccin VapC, planning de vaccination identique au groupe 1.
  - Pour chaque groupe, les poulains issus des juments vaccinées ont reçu le même vaccin, première dose à 6 semaines, les rappels ont été administrés à un âge de 8, 12 et 16 semaines. Tous les poulains ont également reçu un HIP correspondant (VapA, VapAVapC, VapC) dans les 24 heures suivant la naissance.
  - Etude 2/2011 : 30 juments gravides immunisées avec un vaccin VapC (méthode de vaccination identique à l'étude 1). 30 poulains : groupe 1 de 18 poulains (vaccination à

un âge de 2, 6, 10 et 14 semaines), groupe 2 de 2 poulains (vaccination à 4, 7, 11 et 15 semaines), groupe 3 de 10 poulains (vaccination à 4, 6, 10 et 14 semaines).

Résultats : mesure de la prévalence de rhodococcose au cours des 200 jours suivant la naissance. Etude 1 : 1 poulain infecté par *R. equi*. Etude 2 : aucun poulain infecté par *R. equi*. Ces résultats sont à comparer à la prévalence de rhodococcose dans un groupe de 15 poulains non-vaccinés nés en 2010 de juments également non-vaccinés. 11 cas de rhodococcose ont été observés dans ce groupe.

- **Lohmann et al, Canadian Journal of Veterinary Research, 2013** (Kaur *et al.* 2013, Lohmann *et al.* 2013) : vaccin recombinant VapA adjuvanté avec du CPG ODN 2395. 8 poulains immunisés (2 immunisations intra-musculaire à un âge d'un et 15 jours), 7 poulains contrôles. Challenge infectieux intra-bronchial, 2 semaines après la seconde immunisation. Stimulation d'une réponse humorale et modification du profil cytokinique au niveau pulmonaire chez le groupe vacciné (Kaur *et al.* 2013). Pas de différence entre les 2 groupes en termes de protection (Lohmann *et al.* 2013).

#### 4. Vaccin ADN :

- Lopez *et al* rapportent un premier essai de vaccin ADN-rhodococcose chez des poulains (Lopez *et al.* 2003). La première immunisation ADN (VapA) a été administrée par voie intranasale et intra-dermale (V1) à 8 ou 15 jours d'âge, suivi d'un rappel vaccinal (ADN, V2) 2 semaines plus tard et d'un rappel vaccinal de type protéique (protéine VapA recombinante) 30 jours après V1. Une séroconversion a été mesurée chez les poulains vaccinés après la troisième immunisation. La faible réponse du système immunitaire des poulains à l'immunisation ADN est avancée comme un des facteurs qui aurait pu réduire l'immunogénicité du vaccin (potentielle immaturité des cellules APC présentes chez les jeunes poulains par rapport aux chevaux adultes, expression potentiellement réduite des récepteurs TLRs et molécules du CMH de type II et de co-stimulation à la surface des APC (Pargass *et al.* 2009).
- En 2007, Mealey *et al* présentent les résultats d'une forme dérivée de ce vaccin ADN (Mealey *et al.* 2007). Le gène de l'IL-12 (promoteur de la réponse Th1) a été incorporé dans ce vaccin ADN codant pour VapA afin d'agir comme adjuvant cytokinique. 7 poulains (âge ≤7 jours) ont été immunisés (voie intra-dermale et intra-trachéale). Une seconde immunisation ADN a lieu 2 semaines plus tard ainsi qu'un rappel protéique VpaA (sans IL12) 30 jours après V1. Les résultats obtenus confirment la faible immunogénicité de ce vaccin ADN chez le poulain. Cette approche vaccinale présente de nombreux challenges et à ce jour, un seul vaccin ADN a été enregistré pour utilisation chez l'espèce équine pour l'immunisation contre le virus WNV (West Nile virus).

#### 5. Perspectives en matière de comparaison *Mycobacterium bovis* / *Rhodococcus equi*

A l'heure actuelle, la protection contre la tuberculose dépend exclusivement de l'utilisation du vaccin BCG (Bacille de Calmette-Guérin), un vaccin contenant une souche atténuée de *Mycobacterium bovis*, utilisé mondialement depuis 1921. Le vaccin BCG protège efficacement les nouveau-nés mais son efficacité chez les adolescents et adultes est très variable (de 0% à 80% en fonction des études épidémiologiques et essais cliniques considérées). Le vaccin BCG est efficace contre la forme disséminée de la maladie et la méningite tuberculeuse. Toutefois, les taux de protection contre la forme pulmonaire de la tuberculose, l'infection latente ou sa réactivation sont limités. La nature intracellulaire de *M. tuberculosis* joue probablement un rôle important dans ces limitations. Le vaccin BCG induit une réponse de type Th1 et stimule une immunité à médiation cellulaire (la stimulation d'une réponse lymphocytaire T mesurée par l'ELISPOT IFN $\gamma$  est considérée comme un corrélat d'immunité induite par le vaccin BCG et également un corrélat associé à la protection chez les jeunes enfants). En fonction de la forme de la maladie considérée et/ou l'âge des individus vaccinés, cette réponse immunitaire de type cellulaire induite par le vaccin

BCG semble présenter des limitations en termes de protection. L'importance de la réponse immunitaire humorale pourrait également être sous-estimée.

L'immunité protectrice contre *M. tuberculosis* implique la stimulation d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th1 et Th17, avec un rôle essentiel des lymphocytes T CD4+ et la synthèse d'IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ , un rôle probablement important des lymphocytes T CD8+, des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , des lymphocytes T CD1 restreint et de la synthèse d'IL17 et d'IL2. L'activation des lymphocytes B et la synthèse d'anticorps jouent un rôle pour prévenir la dissémination de l'agent pathogène. Les nouvelles approches vaccinales contre la tuberculose ont pour objectif d'activer une majorité de ces mécanismes protecteurs. Plusieurs stratégies existent dont l'amélioration du vaccin BCG avec l'incorporation d'éléments capables d'induire et de renforcer la réponse immunitaire à médiation cellulaire (BCG + vaccin sous-unitaire protéique adjuvé, ou stimulation avec un vecteur viral recombinant), l'administration du vaccin BCG par inhalation afin d'induire une réponse mucoale au niveau pulmonaire (voie d'immunisation similaire à la voie d'infection ; la stimulation d'une réponse Th17 au niveau pulmonaire est faible après administration du vaccin BCG par voie intradermique) ou bien le remplacement du vaccin BCG par une souche inactivée de *Mycobacterium tuberculosis*. Tout comme pour *Rhodococcus equi*, une meilleure caractérisation des corrélats de protection favoriserait le développement de nouveaux vaccins contre la tuberculose.

## Table des matières

<b>1.</b>	<b>Contexte et objet de la saisine</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>Organisation de l'expertise</b> .....	2
<b>3.</b>	<b>Analyse et conclusions du CES</b> .....	2
3.1	<i>Connaissances sur l'agent pathogène</i> .....	3
3.2	<i>Epidémiologie de la maladie, facteurs de risque et mesures sanitaires</i> .....	6
<b>3.2.1.</b>	<b>Etat des connaissances</b> .....	6
3.2.1.1.	Epidémiologie descriptive.....	6
3.2.1.2.	Epidémiologie analytique.....	6
3.2.1.3.	Epidémiologie synthétique, facteurs de risques.....	9
<b>3.2.2.</b>	<b>Réponses aux questions</b> .....	11
3.2.2.1.	Mesures de gestion sanitaire.....	11
3.2.2.2.	Autres mesures de prévention.....	13
<b>3.2.3.</b>	<b>Recommandations</b> .....	14
3.3	<i>Immunologie</i> .....	15
<b>3.3.1.</b>	<b>Réponse immunitaire innée et adaptative vis-à-vis de <i>R. equi</i> chez le poulain : principes généraux</b> .....	15
3.3.1.1.	Réponse immunitaire innée.....	15
3.3.1.2.	Réponse immunitaire adaptative humorale.....	17
3.3.1.3.	Réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	17
<b>3.3.2.</b>	<b>Réponse sérologique chez les équidés infectés</b> .....	19
3.3.2.1.	Etat des connaissances.....	19
3.3.2.2.	Intérêt diagnostique des tests sérologiques.....	23
3.3.2.3.	Conclusions et recommandations.....	24
<b>3.3.3.</b>	<b>Intérêt du plasma hyperimmun dans la prévention médicale de la rhodococcose</b> .....	24
3.3.3.1.	Etat des connaissances.....	24
3.3.3.2.	Recommandations sur le choix du PHI et des modalités d'administration.....	31
3.3.3.3.	Conclusion - questions de recherche et de développement.....	33
<b>3.3.4.</b>	<b>Vaccins et vaccination contre la rhodococcose</b> .....	34
3.3.4.1.	Etat des connaissances.....	34
3.3.4.2.	Conclusion, questions de recherche et perspectives de développement.....	41
<b>3.3.5.</b>	<b>Autovaccins</b> .....	42
3.3.5.1.	Etat des connaissances et situation en France.....	42
3.3.5.2.	Conclusions, recommandations et questions de recherche.....	49
3.4	<i>Diagnostic et prise en charge médicale</i> .....	50
<b>3.4.1.</b>	<b>Etat des connaissances</b> .....	50
3.4.1.1.	Diagnostic de suspicion.....	50
3.4.1.2.	Diagnostic de certitude.....	51
3.4.1.3.	Efficacité des antibiotiques contre <i>Rhodococcus equi</i> .....	52
3.4.1.4.	Mise en évidence de résistances et lutte contre celles-ci.....	54

3.4.1.5.	Effets secondaires des antibiotiques .....	54
3.4.1.6.	Autres voies de traitements en cours d'étude ou à étudier .....	55
3.4.1.7.	Statut réglementaire des principaux antibiotiques cités .....	55
<b>3.4.2.</b>	<b>Réponses aux questions</b> .....	<b>57</b>
3.4.2.1.	Quelle est la méthode diagnostique la plus fiable?.....	57
3.4.2.2.	Quels animaux traiter? .....	57
3.4.2.3.	Quelle est la durée de traitement ? .....	58
3.4.2.4.	Comment améliorer les modalités de traitement ? .....	58
3.4.2.5.	Quelles sont les taux de résistance à la rifampicine ? .....	58
3.4.2.6.	Quelles alternatives aux traitements actuels ?.....	59
<b>3.4.3.</b>	<b>Axes de recherche proposés</b> .....	<b>59</b>
3.5	<i>Dispositions réglementaires</i> .....	59
<b>3.5.1.</b>	<b>Vaccins</b> .....	<b>59</b>
<b>3.5.2.</b>	<b>Plasmas hyperimmuns</b> .....	<b>59</b>
<b>3.5.3.</b>	<b>Autovaccins</b> .....	<b>60</b>
3.6	<i>Conclusions et recommandations</i> .....	61
<b>3.6.1.</b>	<b>Mesures de prévention sanitaire</b> .....	<b>61</b>
<b>3.6.2.</b>	<b>Plasma hyperimmun</b> .....	<b>62</b>
<b>3.6.3.</b>	<b>Vaccin</b> .....	<b>63</b>
<b>3.6.4.</b>	<b>Autovaccins</b> .....	<b>64</b>
<b>3.6.5.</b>	<b>Diagnostic</b> .....	<b>64</b>
<b>3.6.6.</b>	<b>Prise en charge médicale</b> .....	<b>65</b>
<b>4.</b>	<b>Conclusions et recommandations de l'Agence</b> .....	<b>66</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>67</b>
	<b>Annexe 1 : Présentation des intervenants</b> .....	<b>87</b>
	<b>Annexe 2 : Détails des études vaccinales chez l'espèce cible</b> .....	<b>90</b>