



**HAL**  
open science

# Variabilité de détection des moisissures dans les voies respiratoires du cheval : étude expérimentale sur une population de 166 chevaux

Charles Desson

► **To cite this version:**

Charles Desson. Variabilité de détection des moisissures dans les voies respiratoires du cheval : étude expérimentale sur une population de 166 chevaux. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. dumas-04356200

**HAL Id: dumas-04356200**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04356200>**

Submitted on 20 Dec 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation**

ANNEE 2023 - Thèse n°93

# **VARIABILITÉ DE DÉTECTION DES MOISSURES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES DU CHEVAL : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR UNE POPULATION DE 166 CHEVAUX**

## **THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 24 Octobre 2023

par

**Charles DESSON**

Sous la direction de

**Madame Anne COUROUCÉ**

Président du jury : Monsieur François-Xavier BLANC, Professeur à la faculté de médecine de Nantes

Membres du jury : Madame Anne COUROUCÉ, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire,  
Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes - ONIRIS

Monsieur Hervé POULIQUEN, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire,  
Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes - ONIRIS



**Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation**

ANNEE 2023 - Thèse n°93

# **VARIABILITÉ DE DÉTECTION DES MOISSURES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES DU CHEVAL : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR UNE POPULATION DE 166 CHEVAUX**

## **THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 24 Octobre 2023

par

**Charles DESSON**

Sous la direction de

**Madame Anne COUROUCÉ**

Président du jury : Monsieur François-Xavier BLANC, Professeur à la faculté de médecine de Nantes

Membres du jury : Madame Anne COUROUCÉ, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire,  
Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes - ONIRIS

Monsieur Hervé POULIQUEN, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire,  
Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes - ONIRIS



## Liste du corps enseignant

<b>Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment</b>		
Responsable : <b>Emmanuel JAFFRES</b> – Adjointe : <b>Frédérique NGUYEN</b>		
Nutrition et Endocrinologie		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (PR émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solenn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie		
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	
<b>Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique</b>		
Responsable : <b>Raphaël GUATTEO</b> – Adjoint : <b>Jean-Michel CAPPELIER</b>		
Elevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr) Lucile MARTIN (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (MC HDR) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR) Sofia STRUBBIA (MC)

## Département **DSC** Sciences cliniques

Responsable : **Catherine IBISCH** – Adjoint : **Marion FUSELLIER**

Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC HDR) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (MC HDR)

## Département **GPA** Génie des procédés alimentaires

Responsable : **Sébastien CURET-PLOQUIN** – Adjointe : **Vanessa JURY**

Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (MC HDR) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	

## Département **MSC** Management, statistiques et communication

Responsable : **Samira ROUSSELIERE** – Adjointe : **Véronique CARIOU**

Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,  
PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,  
HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens.  
Cont. : Enseignant Contractuel

## Protection droits d'auteur et plagiat

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- NOM et prénom de l'auteur : DESSON Charles
- Année de soutenance : 2023
- Titre de la thèse : VARIABILITÉ DE DÉTECTION DES MOISSURES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES DU CHEVAL : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR UNE POPULATION DE 166 CHEVAUX
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes.
- École de soutenance : Oniris VetAgroBio Nantes École Nationale
- Nombre de pages : 82



## Remerciements

### **À Monsieur François-Xavier Blanc,**

Professeur à la faculté de Médecine de Nantes, Chef de service de Pneumologie au Centre Hospitalier Universitaire de Nantes,

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury,

Veillez accepter mes hommages respectueux et mes sincères remerciements.

### **À Madame Anne Couroucé,**

Professeur à ONIRIS - École Nationale Vétérinaire de Nantes,

Pour m'avoir proposé ce sujet et m'avoir guidé tout au long de ce travail, mais aussi pour m'avoir accompagnée au cours cette année d'approfondissement en équine,

Sincères remerciements.

### **À Monsieur Hervé Pouliquen,**

Professeur à ONIRIS - École Nationale Vétérinaire de Nantes

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse,

Sincères remerciements.

### **À Madame Louise Lemonnier et à Madame Pauline Barbazanges,**

Spécialiste et Résidente en médecine équine à ONIRIS – École Nationale Vétérinaire de Nantes,

Pour votre aide lors de la réalisation de ce travail,

Sincères remerciements.

### **À Monsieur Éric Richard, Madame Marie-Pierre Toquet et à l'équipe de LABEO,**

Pôle d'analyses et de recherche de Normandie,

Pour votre aide et votre disponibilité,

Sincères Remerciements.

# Table des matières

REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIERES .....	6
LISTE DES ABREVIATIONS .....	8
TABLE DES FIGURES.....	9
TABLE DES TABLEAUX.....	10
TABLE DES ANNEXES .....	12
INTRODUCTION.....	13
<b>I - MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>14</b>
1. MATERIELS.....	14
A. Critères d'inclusion .....	14
B. Examen clinique.....	14
C. Test d'hyperventilation forcée.....	15
D. Prise de sang et analyses hémato-biochimiques.....	15
E. Fiche de demande d'analyses – Commémoratifs .....	16
F. Endoscopie des voies respiratoires .....	18
G. Prélèvements respiratoires.....	20
H. Analyses réalisées.....	22
I. Prélèvement de foin.....	26
2. METHODES .....	27
A. Base de données.....	27
B. Outils graphiques.....	27
C. Outils statistiques .....	27
<b>II - RESULTATS .....</b>	<b>29</b>
1. DESCRIPTION DE LA POPULATION D'ETUDE .....	29
A. Âge .....	29
B. Sexe .....	29
C. Hébergement.....	30
D. Alimentation.....	31
E. Signes cliniques rapportés .....	31
F. Examen clinique.....	32
G. Test d'hyperventilation forcée.....	32
H. Endoscopie.....	33
I. Lavage des poches gutturales .....	36
J. Lavage trachéal .....	39
K. Lavages broncho-alvéolaires .....	43
2. PREVALENCE DES ELEMENTS FONGIQUES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES .....	47
A. Lavages des poches gutturales.....	47
B. Lavage trachéal .....	47
C. Lavages broncho-alvéolaires .....	48
3. COMPARAISON DES METHODES DE DETECTION DES ELEMENTS FONGIQUES .....	50
4. COMPARAISON DES SITES DE DETECTION.....	50
A. Comparaison des prélèvements de lavage broncho-alvéolaires.....	51
B. Comparaison du lavage trachéal et du mélange des LBA .....	51

5.	COMPARAISON DES ELEMENTS FONGIQUES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES ET DANS LE FOIN.....	51
6.	RECHERCHE DE CORRELATIONS ENTRE LA PRESENCE D'ELEMENTS FONGIQUES ET L'HEBERGEMENT, L'ALIMENTATION ET LES SIGNES CLINIQUES RAPPORTES. ....	53
	A. <i>Éléments fongiques et environnement des chevaux</i> .....	53
	B. <i>Éléments fongiques et signes cliniques rapportés</i> .....	56
	C. <i>Éléments fongiques et résultats endoscopiques, cytologiques, bactériologiques et virologiques</i> .....	58
7.	RECHERCHE DE FACTEURS DE RISQUE DE LA PRESENCE D'ELEMENTS FONGIQUES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES.....	60
	A. <i>Cytologie positive dans le lavage trachéal</i> .....	60
	B. <i>Culture fongique positive dans le lavage trachéal</i> .....	60
	C. <i>Cytologie positive dans le lavage broncho-alvéolaire</i> .....	61
	D. <i>Culture fongique positive dans le lavage broncho-alvéolaire</i> .....	61
<b>III -</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>62</b>
1.	CONSTITUTION DE LA POPULATION D'ETUDE.....	62
2.	MISE EN PERSPECTIVE DES METHODES UTILISEES .....	63
	A. <i>Méthodes de prélèvement</i> .....	63
	B. <i>Méthodes d'analyse</i> .....	64
3.	RECHERCHE DES ELEMENTS FONGIQUES ET PREVALENCE.....	65
4.	COMPARAISON DES METHODES ET SITES DE DETECTION .....	66
5.	MISE EN PERSPECTIVE DES CORRELATIONS OBTENUES CONCERNANT LA DETECTION DES ELEMENTS FONGIQUES .....	67
6.	ÉLEMENTS FONGIQUES DANS LE FOIN ET LES VOIES RESPIRATOIRES .....	68
7.	LIMITES DE L'ETUDE.....	68
	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>70</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>71</b>
	<b>ANNEXE</b> .....	<b>75</b>
	ANNEXE 1 : FEUILLE DE COMMÉMORATIFS ET D'ANAMNESE – DEMANDE D'ANALYSE : .....	75

## Liste des abréviations

CISCO : Centre international de santé du cheval d'Oniris  
EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique  
HPIE : Hémorragie pulmonaire induite à l'exercice  
H/M : Hémosidérophages/Macrophages  
LBA : Lavage broncho-alvéolaire  
LBAg : Lavage broncho-alvéolaire du poumon gauche  
LBA<sub>d</sub> : Lavage broncho-alvéolaire du poumon droit  
LBA<sub>m</sub> : mélange des lavages broncho-alvéolaires des deux poumons  
LPG : Lavage des poches gutturales  
LT : Lavage trachéal  
mEA : Asthme équin modéré  
MGG : May-Grünwald-Giemsa  
mL : Millilitres  
Na : Non analysé  
OGA : Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar  
PCR : Polymerase chain reaction  
PE : Polynucléaires éosinophile  
PN : Polynucléaire neutrophile  
sEA : Asthme équin sévère  
SIT : Syndrome d'inflammation trachéale

## Table des figures

Figure 1 - Photographie montrant la mise en place du sac pour la réalisation du test d'hyperventilation forcée (crédit photo : Dr Pauline Barbazanges) .....	15
Figure 2 - Photographie montrant l'installation de l'équipe vétérinaire et de l'équipe du laboratoire dans les écuries (crédit photo : Dr Margot Cessans) .....	20
Figure 3 - Photographie de trachée réalisée par endoscopie lors d'un lavage trachéal (Crédit photo CISCO) .....	21
Figure 4 – Répartition du nombre de chevaux selon leur âge .....	29
Figure 5 – Répartition des sexes dans la population exprimée en pourcentage .....	30
Figure 6 - Répartition des différents types d'hébergement dans la population .....	30
Figure 7 – Répartition des différents types de foin donnés au chevaux .....	31
Figure 8 - Fréquence des signes cliniques rapportés dans la population .....	32
Figure 9 - Fréquence des différentes anomalies rencontrées lors du test au sac. ....	33
Figure 10 - Proportions des différents grades de pharyngite dans notre population .....	34
Figure 11 - Image endoscopique montrant une pharyngite folliculaire hyperplasique de grade 3 /4 (Crédit photo CISCO) .....	34
Figure 12 - Fréquence des différentes anomalies observées dans les poches gutturales .....	35
Figure 13 - Proportions des différents grades de mucus trachéal dans notre étude .....	36
Figure 14 - Image endoscopique d'une trachée présentant un score de mucus trachéal de 5/5 (Crédit photo CISCO) .....	36
Figure 15 - Prévalence de détection des éléments fongiques dans les différents prélèvements respiratoires (N.S = non significatif, * = significativement différent) .....	50

## Table des tableaux

Tableau 1 - Paramètres hématologiques.....	16
Tableau 2 - Paramètres biochimiques .....	16
Tableau 3 - Échelle de notation du degré de pharyngite folliculaire hyperplasique .....	19
Tableau 4 - Échelle de notation de l'abondance du mucus trachéal .....	20
Tableau 5 - Synthèse des analyses réalisées sur les différents prélèvements.....	23
Tableau 6 - Valeurs seuils utilisées pour la cytologie des lavages broncho-alvéolaires .....	24
Tableau 7 - Les différents milieux de culture utilisés pour isolement direct.....	25
Tableau 8 - Les différents milieux de culture utilisés pour dénombrement.....	25
Tableau 9 - Barème de Landis et Koch pour l'interprétation du coefficient Kappa de Cohen.....	28
Tableau 10 - Aspect macroscopique des lavages de poches gutturales ; couleur et transparence (en haut), consistance (en bas).....	37
Tableau 11 - Proportion des différentes cellules dans le mélange des lavages des poches gutturales .....	38
Tableau 12 - Détails des identifications fongiques obtenues sur le prélèvement de mélange des lavages des poches gutturales.....	38
Tableau 13 - Aspect macroscopique des prélèvements de lavage trachéal (Couleur en haut, et transparence et consistance en bas) .....	39
Tableau 14 - Pourcentages des populations cellulaires dans le lavage trachéal .....	40
Tableau 15 - Les différents germes identifiés par culture sur le lavage trachéal .....	41
Tableau 16 - Détails des identifications fongiques obtenues sur le prélèvement de lavage trachéal .....	42
Tableau 17 - Recherche de virus respiratoires par PCR.....	43
Tableau 18 - Volumes récoltés lors des lavages broncho-alvéolaires droit et gauche .....	43
Tableau 19 - Aspect macroscopique (couleur) des lavages broncho-alvéolaires .....	44
Tableau 20 - Aspect macroscopique (transparence et consistance) des lavages broncho-alvéolaires .....	44
Tableau 21 - Proportions cellulaires des différents prélèvements de lavages broncho-alvéolaires (L = lymphocytes, Macro =macrophages, H = hémosidérophages, Masto = mastocytes) .....	45
Tableau 22 - Proportion des bactéries, hématies et spirales de Curshmann observées dans la cytologie des LBA.....	45
Tableau 23 - Pourcentage de présence d'éléments fongiques dans la cytologie des lavages broncho-alvéolaires.....	46
Tableau 24 - Détails des identifications fongiques obtenues sur le prélèvement de mélange des lavages broncho-alvéolaires .....	46
Tableau 25 - Table de contingence entre la culture et la cytologie du mélange des lavages des poches gutturales .....	47
Tableau 26 - Table de contingence entre la culture et la cytologie du lavage trachéal .....	48
Tableau 27 - Pourcentage des différents éléments fongiques visualisés lors de la cytologie dans le lavage trachéal .....	48

Tableau 28 - Table de contingence entre la culture et la cytologie du mélange des lavages broncho-alvéolaires.....	49
Tableau 29 - Pourcentage des différents éléments fongiques visualisés lors de la cytologie du mélange des lavages broncho-alvéolaires.....	49
Tableau 30 - Recherche de l'accord entre la culture fongique et la cytologie dans les différents prélèvements respiratoires .....	50
Tableau 31 - Recherche de l'accord entre les cytologies des prélèvements de LBA .....	51
Tableau 32 - Recherche de l'accord entre le LT et le LBAm, en culture et en cytologie.....	51
Tableau 33 - Dénombrement et identification des moisissures dans le foin .....	52
Tableau 34 - Recherche d'associations entre l'environnement et les éléments fongiques dans le lavage trachéal .....	54
Tableau 35 - Recherche d'associations entre l'environnement et les éléments fongiques dans le mélange des lavages broncho-alvéolaires.....	55
Tableau 36 - Recherche d'associations entre les signes cliniques rapportés et les éléments fongiques dans le lavage trachéal .....	56
Tableau 37 - Recherche d'associations entre les signes cliniques rapportés et les éléments fongiques dans le mélange des LBA .....	57
Tableau 38 - Recherche d'associations entre différents résultats obtenus et les éléments fongiques dans le lavage trachéal .....	58
Tableau 39 - Recherche d'associations entre différents résultats obtenus et les éléments fongiques dans le lavage broncho-alvéolaire.....	59
Tableau 40 - Effectifs, prélèvements et volumes utilisés dans les articles déjà publiés.....	62
Tableau 41 - Comparaison des prévalences de détection des éléments fongiques obtenus dans différentes études .....	66

## Table des annexes

Annexe 1 : Fiche de demande d'analyse - commémoratifs et anamnèse.....	75
--	----



## Introduction

Les affections respiratoires du cheval constituent une dominante pathologique en médecine équine. Elles peuvent être subcliniques et sources de contre-performance, mais aussi responsables de maladies plus graves, affectant la santé et la qualité de vie du cheval. Ces affections constituent la deuxième cause de réforme du cheval de course, après les boiteries. Les maladies les plus fréquemment rencontrées sont l'asthme équin, l'hémorragie pulmonaire induite à l'exercice et le syndrome d'inflammation trachéale.

L'asthme équin est une inflammation des voies respiratoires profondes, qui peut être modéré ou sévère, et caractérisé par des contre-performances, une toux plus ou moins fréquente et des difficultés respiratoires au repos dans sa forme sévère. Les asthmes équin et humain partagent de nombreuses caractéristiques communes, ce qui rend ces maladies comparables entre elles. Chez l'homme, les levures et champignons ont un impact bien décrit, agissant à la fois comme des agents sensibilisants et aggravants de l'asthme (Denning et al. 2014).

Certaines études récentes s'intéressent à la présence de ces moisissures dans les voies respiratoires des chevaux. En effet, elles seraient présentes dans la trachée de 79% des chevaux lors d'examen cytologique et 55% des chevaux lors de culture fongique (Dauvillier, Ter Woort, van Erck-Westergren 2019). Cependant, l'incidence clinique de ces moisissures reste incertaine.

L'objectif de cette étude était donc de réaliser un grand nombre de prélèvements et d'analyses respiratoires sur des chevaux à l'entraînement, mais aussi sur des chevaux référés pour des problèmes respiratoires au Centre International de Santé du Cheval d'Oniris (CISCO), afin de comparer les différentes méthodes de détection des éléments fongiques et d'étudier leur prévalence dans les différents segments de l'arbre respiratoire. Ces résultats devraient permettre d'étudier ultérieurement l'implication des moisissures dans l'asthme équin.

Il s'agira donc tout d'abord de déterminer la prévalence d'éléments fongiques dans les voies respiratoires des chevaux, puis de comparer deux méthodes de détection, la cytologie et la culture fongique, et de comparer les différents lieux de prélèvement, trachée et poumon. Enfin nous rechercherons d'éventuels facteurs prédisposants à la présence de ces éléments fongiques dans les voies respiratoires.

Nous présenterons d'abord les matériels et méthodes employés afin de réaliser cette étude, puis les résultats obtenus seront détaillés en deuxième partie. Enfin, nous discuterons des apports de cette étude et confronterons nos résultats à la bibliographie.

# I - Matériels et méthodes

## 1. Matériels

Ce travail de thèse a exploité des données expérimentales obtenues sur le terrain.

### A. Critères d'inclusion

Cette étude expérimentale a été réalisée sur le terrain. Les chevaux inclus dans cette étude étaient répartis en deux groupes ; des trotteurs français à l'entraînement et des chevaux référés au Centre International de Santé du Cheval d'Oniris (CISCO) pour exploration de problèmes respiratoires. Le premier groupe était constitué de Trotteurs Français, à l'entraînement au moment des prélèvements. Ces chevaux étaient soit des animaux sains, soit des chevaux ayant un historique de contre-performance, et ne présentaient aucun signe clinique évident de maladie respiratoire. Les prélèvements ont été réalisés sur 82 chevaux, étalés sur 15 journées, entre février 2020 et janvier 2023. Chaque journée a permis de prélever 6 chevaux. Parmi ceux-là, 8 chevaux ont été prélevés deux fois, à un an d'intervalle. Ce premier groupe comprenait donc 90 prélèvements. Le deuxième groupe était constitué de 84 chevaux, de race, d'âge et de niveau d'activité variables, référés au CISCO pour des problèmes respiratoires, présentés entre mars 2020 et avril 2023. À chaque session de prélèvement, le personnel du laboratoire Labéo - Franck Duncombe® était présent sur place afin de traiter les échantillons immédiatement et accélérer les analyses. Les examens, prélèvements et analyses réalisés sur les deux groupes de chevaux étaient les mêmes et les délais d'acheminement et de traitement des prélèvements étaient comparables. La population était donc composée de 166 chevaux, totalisant 174 prélèvements.

Aucun critère d'exclusion n'a été retenu dans le cadre de cette étude, dont le protocole a reçu l'approbation du comité d'éthique d'Oniris (numéro : CERVO-2020-3-V).

### B. Examen clinique

Un examen clinique complet a été systématiquement réalisé sur tous les chevaux de l'étude. Cet examen comprend la prise de température rectale, une auscultation cardio-pulmonaire avec mesure des fréquences respiratoire et cardiaque, mais aussi l'examen des muqueuses, la palpation des nœuds lymphatiques sous-mandibulaires et un examen des voies respiratoires (présence ou absence de toux et de jetage nasal). Par ailleurs, une note d'état corporel, évaluée sur 5, a été attribuée à chaque cheval. Ces données ont été rassemblées sur la fiche de demande d'analyse, présentée en Annexe 1.

### C. Test d'hyperventilation forcée

Le test d'hyperventilation forcée ou « test au sac », permettant d'augmenter la sensibilité de l'auscultation pulmonaire chez le cheval, a été systématiquement réalisé dans cette étude.

Lors du test, un sac était placé de façon hermétique sur les naseaux du cheval sans les obstruer, pendant une minute, puis était retiré. L'hypercapnie générée se traduit par une augmentation de la fréquence et de l'amplitude respiratoire, permettant une auscultation plus fine lorsque le sac est en place mais surtout pendant la phase de récupération.

La tolérance, la rapidité de retour à une respiration normale, l'induction d'une toux, les éventuels crépitements, sifflements ou râles trachéaux ont été notés et rapportés sur la fiche de demande d'analyses.



*Figure 1 - Photographie montrant la mise en place du sac pour la réalisation du test d'hyperventilation forcée (crédit photo : Dr Pauline Barbazanges)*

### D. Prise de sang et analyses hémato-biochimiques

Une prise de sang a été réalisée sur chaque cheval, préalablement à toute sédation.

L'échantillon a été récolté à la veine jugulaire droite ou gauche indistinctement, avant tout examen.

Une numération, une formule sanguine ainsi qu'une analyse biochimique ont été réalisées.

Les paramètres hémato-biochimiques mesurés sur la prise de sang sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 - Paramètres hématologiques

Numération Globulaire	Hématies
	Leucocytes
	Hémoglobine
	Hématocrite
	Volume Globulaire Moyen
	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
	Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
Formule sanguine	Polynucléaires Neutrophiles
	Polynucléaires Éosinophiles
	Polynucléaires Basophiles
	Monocytes
	Grands lymphocytes
	Petits lymphocytes
Numération des plaquettes	Plaquettes

Tableau 2 - Paramètres biochimiques

Acides biliaires
Bilirubine
Glutamate déshydrogénase
Créatine phosphokinase
Créatinine
Gamma-glutyltransférase
Protéines
Albumine
Transaminase GOT – ASAT
Urée
Fibrinogène

#### E. Fiche de demande d'analyses – Commémoratifs

Pour chaque cheval inclus dans l'étude, une fiche de demande d'analyses a été remplie, afin de récolter les informations liées aux prélèvements, mais aussi l'identité du cheval ainsi que les commémoratifs et l'anamnèse.

Les informations suivantes ont été recueillies par des champs à remplissage libre, ou bien par des cases à cocher et rassemblées sur la fiche d'analyse. La fiche utilisée est présentée en Annexe 1.

#### *Identification de l'animal :*

- Nom complet du cheval
- Numéro d'identification (n° SIRE), race, sexe, date de naissance
- Nom et adresse du propriétaire

#### *Environnement et alimentation :*

- Hébergement : *Box, pré, paddock, mixte*
- Litière : *Paille, Copeaux, Autre*
- Fourrage : *foin sec, foin trempé, foin stérilisé, enrubanné, présentation en filet, présentation à terre*
- Suppléments : *céréales, concentrés (granulés, mash,...), compléments*

#### *Entraînement et activité*

- Repos
- Entraînement
- Compétition (type)
- Nombre de départs
- Classement

#### *Signes cliniques*

- Dyspnée
- Toux : *rare, fréquente, début d'exercice*
- Jetage : *séreux, muqueux, purulent*
- Dilatation des naseaux
- Contre-performance
- Intolérance à l'effort
- Epistaxis
- Autres

#### *Examen clinique et endoscopie*

- État corporel (/ 5)
- Température rectale
- Fréquence cardiaque
- Fréquence respiratoire
- Pharyngite (/ 4)
- Larynx
- Poches gutturales
- Aspect des muqueuses : *normales, congestionnées, pâles, cyanosées, jaunes-orange, TRC*
- Ganglions sous-mandibulaires : *non palpables, palpables, hypertrophiés, douloureux*
- Courbe respiratoire

- Auscultation au sac :  
Tolérance : *bonne, mauvaise*  
Temps de récupération : *normal, augmenté*  
Crépitements : *léger, modéré, marqué*  
Sifflements : *léger, modéré, marqué*
- Toux déclenchée : *au sac, à l'endoscopie*
- Sang trachéal (/ 4)
- Mucus trachéal (/ 5)
- Autres

#### *Prélèvements :*

Volumes récupérés :

Poches gutturales : gauche et droite

Lavage trachéal

Lavages broncho-alvéolaires : gauche et droit

#### *Analyses demandées*

Prise de sang :

Hématologie et biochimie

Cytologie (coloration MGG) :

Mélange des poches gutturales, lavage trachéal, lavages broncho-alvéolaires droit, gauche et mélangés

Bactériologie :

Lavage trachéal

Mycologie :

Mélange des lavages des poches gutturales, lavage trachéal, mélange des lavages broncho-alvéolaires

Biologie moléculaire :

PCR Streptococcus equi : mélange des poches gutturales

PCR virus respiratoires (8 valences) : lavage trachéal

## F. Endoscopie des voies respiratoires

Une endoscopie respiratoire a été réalisée systématiquement. Les chevaux ont le plus souvent été sédatisés à l'aide de détomidine (10 µg/kg par voie intraveineuse) et éventuellement de butorphanol (10 à 20 µg/kg par voie intraveineuse), selon leur tempérament mais aussi selon le délai avant la course ou compétition suivante. En effet, il est nécessaire d'appliquer un temps d'attente réglementaire entre l'usage de sédatifs et les compétitions sportives, afin que ces molécules soient complètement éliminées de l'organisme, leur usage étant interdit en compétition.

Un vidéoendoscope respiratoire de marque AOHUA<sup>®</sup>, lors de déplacement dans les écuries, ou bien OLYMPUS<sup>®</sup> au CISCO, de 120 cm de longueur a été inséré dans le naseau droit ou gauche indifféremment, et des images photographiques ont été enregistrées.

Le pharynx a également été inspecté : permettant d'évaluer le degré de pharyngite à l'aide d'une note sur 4. Le larynx et les poches gutturales ont été visualisés, ce qui a permis de noter d'éventuelles anomalies. Celles-ci ont été reportées sur la fiche de demande d'analyses, notamment en cas d'hémiplégie laryngée. Puis l'endoscope a été inséré dans la trachée, permettant ainsi de constater la présence ou l'absence de sang et d'évaluer la quantité de mucus présent dans cette dernière. Enfin, la carène a également été visualisée.

Le grade de pharyngite a été évalué sur une échelle de 0 à 4 (Raker, Boles 1978; Auer, Wilson, Groenendyk 1985), présentée dans le Tableau 3.

*Tableau 3 - Échelle de notation du degré de pharyngite folliculaire hyperplasique*

<b>Grade</b>	<b>Description</b>
0	Pas de pharyngite
1	Quelques petits follicules blancs et inactifs, localisés sur la paroi dorsale du pharynx
2	Nombreux petits follicules blancs, s'étendant latéralement aux parois du pharynx
3	Nombreux follicules rosés et blancs, proches les uns des autres, couvrant entièrement les parois dorsale et latérales du pharynx. Ils envahissent toute la paroi muqueuse du pharynx
4	Les follicules apparaissent plus large et plus œdématisés que dans le grade 3, et couvrent la même surface. Ils peuvent s'étendre jusque dans les poches gutturales et des lésions similaires à des polypes peuvent émerger de la muqueuse

Le score de mucus trachéal a été évalué selon une échelle de 0 à 5 (Gerber et al. 2004) présentée dans le Tableau 4.

Tableau 4 - Échelle de notation de l'abondance du mucus trachéal

Grade	Description
0	Absence de mucus visible
1	Quelques petites gouttes individuelles
2	Multiplés gouttes, plus larges, non confluentes
3	Mucus confluent en région ventrale
4	Mucus confluent, formant des flaques
5	Mucus en quantité profuse, sur toute la longueur de la trachée

Entre chaque cheval, l'endoscope a été nettoyé, désinfecté et rincé, selon les recommandations du fabricant, afin d'éviter de potentielles contaminations croisées.

### G. Prélèvements respiratoires

Les prélèvements respiratoires réalisés sont les suivants : écouvillons naso-pharyngés, lavage des deux poches gutturales, lavage trachéal, lavage broncho-alvéolaire des poumons droit et gauche. Ils ont ensuite été traités directement par le personnel du laboratoire présent sur place : ils ont été centrifugés et répartis en différents aliquots, certains en vue d'analyses immédiates, d'autres conservés dans le cas où des analyses supplémentaires seraient nécessaires.



Figure 2 - Photographie montrant l'installation de l'équipe vétérinaire et de l'équipe du laboratoire dans les écuries (crédit photo : Dr Margot Cessans)



### *Écouvillon naso-pharyngé*

Avant le passage de l'endoscope, des écouvillons naso-pharyngés ont été réalisés dans chaque narine à l'aide d'un écouvillon (environ 30 cm) inséré dans le méat nasal ventral du naseau correspondant puis mis en rotation et extrait de la narine.

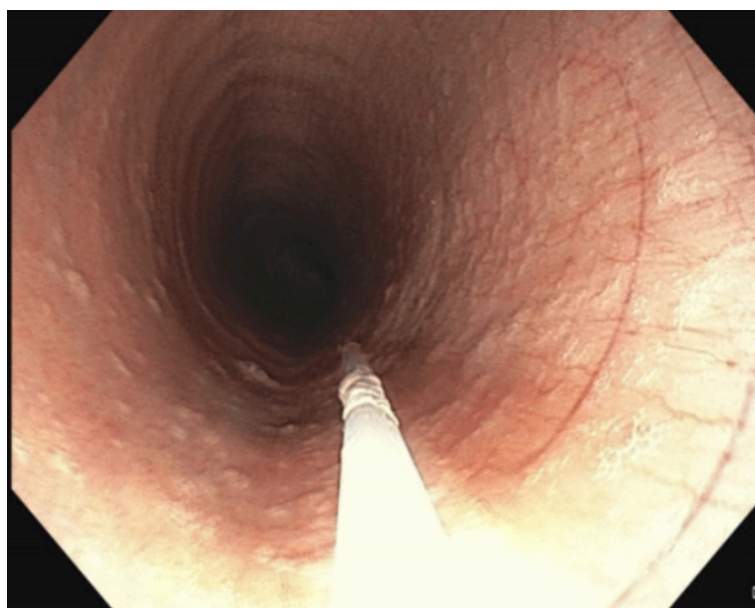
### *Lavage des poches gutturales*

Les poches gutturales droite et gauche ont été lavées successivement. Une fois l'endoscope inséré dans la poche gutturale, 40 mL de solution de sérum physiologique tiédie (Chlorure de sodium à 0,9%, placé dans une étuve à 37°C) sont injectés, par le biais d'un cathéter stérile à double lumière à usage unique.

Ce liquide a ensuite été réaspiré par la même voie afin d'évaluer le volume extrait ainsi que son aspect macroscopique. La procédure a été répétée dans la seconde poche gutturale. Les deux lavages ont ensuite été mis en commun dans une bouteille stérile de 125 mL, à partir de laquelle ont été prélevés 4 mL de solution dans un tube EDTA et deux fois 10 mL dans deux tubes stériles de 15 mL chacun.

### *Lavage trachéal*

Un lavage trachéal a ensuite été systématiquement réalisé. Une fois dans la trachée, 40 mL de solution de sérum physiologique tiédie ont été injectés, par le biais d'un cathéter stérile. L'endoscope a ensuite été avancé afin de réaspirer le liquide. Le volume récupéré ainsi que l'aspect macroscopique du liquide ont été notés. Sur ce volume, 4 mL ont été disposés dans un tube EDTA et deux fois 5 mL dans des tubes stériles de 15 mL.



*Figure 3 - Photographie de trachée réalisée par endoscopie lors d'un lavage trachéal (Crédit photo CISCO)*

### *Lavage broncho-alvéolaire*

Les lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés à l'aide d'un vidéoendoscope AOHUA® ou OLYMPUS® de 320 cm de longueur. Il a été introduit là aussi par l'un des deux naseaux, puis dans la trachée, et enfin dans l'un des deux poumons au niveau de la carène puis a été enfoncé au maximum. Par le biais du canal opérateur de l'endoscope, 250 mL de solution de sérum physiologique stérile tiédie ont été injectés et réaspirés, en prenant soin de jeter les premiers 20 mL réaspirés, correspondant au volume résiduel dans le canal. L'opération a été répétée une deuxième fois : 500 mL de solution ont donc été injectés dans le premier poumon. 60 mL de sérum physiologique stérile sont alors injectés afin de rincer l'endoscope. L'endoscope a ensuite été reculé jusqu'à la carène et introduit dans le poumon controlatéral. La procédure précédemment décrite a été répétée pour ce poumon, afin d'atteindre un volume total instillé de 1 L. Les volumes récoltés et l'aspect macroscopique des liquides obtenus ont été notés. Pour chaque poumon, le liquide de lavage a été collecté dans une bouteille de 500 mL, à partir de laquelle ont été prélevés 4 mL de liquide dans un tube EDTA. Puis un mélange correspondant au prorata des volumes récoltés lors des deux lavages a été constitué.

Le volume final de mélange M était de 100 mL, composé de  $x'$  mL du LBA droit et  $y'$  mL du LBA gauche, avec x et y les volumes récoltés des LBA droit et gauche.

Soit :

$$M = x' + y' = 100 \text{ mL}$$

$$x' = 100 * [x / (x+y)]$$

$$y' = 100 * [y / (x+y)]$$

Sur le mélange ainsi obtenu, 4 mL ont été placés dans un tube EDTA, et 10 mL dans un tube de 15 mL.

### *H. Analyses réalisées*

Sur tous les prélèvements, une analyse cytologique a été réalisée systématiquement. Une culture fongique a été réalisée sur le mélange des poches gutturales, sur le lavage trachéal et le mélange des LBA. Une culture bactériologique a été réalisée sur le lavage trachéal, et certaines bactéries ou virus ont été recherchés sur le mélange des poches gutturales (Recherche de l'agent de la gourme), et sur le lavage trachéal (8 virus respiratoires ainsi que les mycoplasmes). Ces analyses effectuées par le laboratoire Labéo – Frank Duncombe® sont rassemblées dans le Tableau 5.

Le prélèvement conservé dans un flacon EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) est utilisé pour les cytologies. Les analyses microbiologiques ont quant à elles été réalisées à partir des tubes stériles remplis sur le terrain.

Tableau 5 - Synthèse des analyses réalisées sur les différents prélèvements

	Cytologie	Mycologie	Bactériologie	Biologie moléculaire
<b>Mélange des poches gutturales</b>	Oui	Oui		Oui (PCR <i>Streptococcus equi equi</i> )*
<b>Lavage trachéal</b>	Oui	Oui	Oui (avec antibiogrammes en cas de résultats positifs)	Oui (8 virus respiratoires et mycoplasmes)
<b>Mélange des LBA</b>	Oui	Oui		
<b>LBA droit</b>	Oui			
<b>LBA gauche</b>	Oui			

### Cytologie

Pour chaque prélèvement, une analyse macroscopique a été réalisée. La couleur, la consistance et la transparence étaient décrits. Pour l'analyse cytologique, deux lames étaient préparées, la première étant un étalement direct, la deuxième une concentration des cellules.

Pour cette dernière, le prélèvement était cytocentrifugé. 300 microlitres de mélange de lavage et d'eau physiologique étaient centrifugés à l'aide d'une cytocentrifugeuse, sur des lames spécifiques, à la vitesse de concentration de 800 tours par minute pendant 10 minutes. Les deux lames ont été colorées au May-Grünwald-Giemsa (MGG). L'abondance cellulaire dans les prélèvements était notée, et selon celle-ci, la cytologie était lue soit sur l'étalement direct, soit sur la concentration des cellules. Dans les deux cas, la lecture était faite sur 300 cellules. Les lames étaient par ailleurs préparées le même jour que le prélèvement. Les différentes proportions cellulaires observées étaient renseignées, ainsi que la présence de différents éléments fongiques : spores et hyphes, libres ou phagocytés. La présence de bactéries et/ou d'hématies était également notée. Selon les proportions des différents types cellulaires, un cytodagnostic a pu être établi.

Dans le cas du lavage trachéal, le cytodagnostic était établi comme suit :

- Au-delà de 20% de polynucléaires neutrophiles : inflammation trachéale et Syndrome d'inflammation trachéale (SIT).
- Au-delà de 70% de PN : Inflammation trachéale sévère.
- Rapport hémositérocytes / macrophages > 20% : diagnostic d'hémorragie pulmonaire induite à l'exercice (HPIE).

Dans le cas du LBA, les valeurs seuils employées sont détaillées dans le Tableau 6.

Tableau 6 - Valeurs seuils utilisées pour la cytologie des lavages broncho-alvéolaires

Prélèvement	LBA mélange	LBA gauche et droit
<b>Polynucléaires neutrophiles</b>	< 9% : non inflammatoire De 9 à 25% : inflammation modérée > 25% : inflammation sévère	< 10% : non inflammatoire De 10 à 25% : inflammation modérée > 25% : inflammation sévère
<b>Polynucléaires éosinophiles</b>	> 5% : inflammatoire	
<b>Mastocytes</b>	> 3% : inflammatoire	
<b>Hémosidérophages / Macrophages</b>	> 17% : HPIE	

Ces valeurs ont été fixées selon recommandations des dernières publications, et de la publication de consensus sur l'asthme équin modéré (Couëtil et al. 2016).

### *Mycologie*

Les cultures fongiques ont été réalisées sur le lavage trachéal, le mélange des poches gutturales et le mélanges des lavages broncho-alvéolaires.

Pour ce faire, différentes géloses ont été incubées pour tous les prélèvements. L'incubation a duré 6 jours à 30°C. Deux géloses ont été mises en incubation pour un isolement direct (Sabouraud + acitidione et Sabouraud + gentamicine) pour tous les prélèvements.

Une gélose OGA (Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar) est mise en incubation à partir du lavage trachéal, afin de réaliser une quantification en masse des levures et moisissures.

Les identifications mycologiques sont réalisées par une observation macroscopique et microscopique pour tous les prélèvements.

### *Bactériologie*

Les analyses bactériologiques ont été réalisées sur le lavage trachéal. Les différents milieux et conditions de culture sont synthétisés dans les tableaux 7 et 8.

Lorsqu'une croissance bactérienne était observée pour plus de 3 germes différents dans le même prélèvement, l'identification n'était pas réalisée étant donné la forte probabilité que celui-ci ait subi une contamination. La mention « flore polymorphe sans prédominance de germe » était alors notée sur le compte-rendu.

Tableau 7 - Les différents milieux de culture utilisés pour isolement direct

Milieu de culture	Température d'incubation	Atmosphère	Durée d'incubation	Germes recherchés
Bouillon mycoplasmes	37°C	7% CO <sub>2</sub>	3 jours puis analyse PCR	<i>Mycoplasma spp</i>
Columbia sang de mouton	37°C	Aérobie	48h	Aide à la détermination des germes anaérobies stricts
Columbia sang de mouton	37°C	Anaérobie	48h	Germes anaérobies stricts

Tableau 8 - Les différents milieux de culture utilisés pour dénombrement

Milieu de culture et dilution	Température d'incubation	Atmosphère	Durée d'incubation	Germes recherchés
Columbia sang de mouton (dilution à 10 <sup>4</sup> et 10 <sup>6</sup> )	37°C	Aérobie	48h	Bactéries aérobies (Streptococques, Staphylococques, Actinobacilles, Pasteurelles, etc...)
Columbia sang de mouton (dilution à 10 <sup>3</sup> )	37°C	Aérobie	48h	Contrôle de cohérence pour les dilutions à 10 <sup>4</sup> et 10 <sup>6</sup>
Columbia sang de mouton (dilution à 10 <sup>4</sup> )	30°C	Aérobie	48h	Germes avec optimum de croissance à 30°C ( <i>Pseudomonas spp</i> , <i>Fluorescens</i> )
EMB (dilution à 10 <sup>4</sup> et 10 <sup>6</sup> )	37°C	Aérobie	48h	Entérobactéries, <i>Pseudomonas spp</i>
Chocolat (dilution à 10 <sup>4</sup> )	37°C	7% CO <sub>2</sub>	48h	<i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Nicoletella semolina</i>

Sur le mélange des poches gutturales, une recherche de l'agent de la gourme, *Streptococcus equi* a été réalisée par PCR temps réel.

Sur le lavage trachéal, les virus respiratoires les plus fréquemment rencontrés ont été recherchés par PCR temps réel aussi. Il s'agit donc des agents de la grippe équine (Equine influenza virus), des herpèsvirus (Equine herpesvirus : EHV-1, EHV-2, EHV-4 et EHV-5), mais aussi de l'adénovirus 1 et des rhinovirus A et B.

Le virus de la grippe équine ainsi que les rhinovirus sont des virus à ARN. Ils ont donc été recherchés par RT-PCR temps réel.

La présence de mycoplasmes a aussi été diagnostiquée sur le lavage trachéal, par une PCR temps réel après une période d'incubation de 3 jours sur un milieu spécifique (Tableau 5).

## I. Prélèvement de foin

Lors des sessions de prélèvements dans les écuries d'entraînement des trotteurs, un échantillon de foin était collecté pour une analyse bactériologique et mycologique par culture. Le foin prélevé était celui avec lequel les chevaux prélevés étaient nourris.

Un échantillon d'environ 1 kg a été prélevé et mis à sécher une nuit à 37°C. Il a ensuite été broyé et mis en culture. Un mélange de 20g de broyat et de 180 mL d'eau peptonée tamponnée a été constitué, puis 1 mL de solution diluée a été mis en culture dans des géloses d'agar, dans le but de compter la flore bactérienne totale. Les boîtes ont été placées en incubation à 37°C et les comptages ont été réalisés aux 2<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour d'incubation. Parallèlement, des géloses OGA ont été coulées avec la solution précédente et incubées à 25°C, pour la culture mycologique. Les colonies mises en évidence ont été isolées sur une gélose Sabouraud et incubées pendant 5 jours à 25°C, puis identifiées par un étalement sur une lame colorée au bleu Trypan.

## 2. Méthodes

### A. Base de données

Les données obtenues sur la feuille de renseignements et les résultats fournis par le laboratoire ont été centralisés sur un tableur. A ces données s'ajoutent la date de réception des prélèvements par le laboratoire et le groupe d'étude auquel appartient le cheval.

Le tableur a été réalisé à l'aide du logiciel Excel<sup>®</sup>, dans lequel une ligne correspondait à un cheval et une colonne correspondait à un paramètre. Un numéro de dossier associé à chaque prélèvement a permis d'anonymiser les résultats dans le cadre de notre étude. Toutes les données récoltées ont été intégrées dans le tableur même si elles n'ont pas toutes été utilisées pour cette étude.

#### *Feuille de demande d'analyses*

Les informations renseignées sur la feuille de demande d'analyses ont été ajoutées dans la banque de données de l'étude. Les données qualitatives, de type présence ou absence, ont été codées respectivement en 1 ou 0. Les données quantitatives, gradées, ainsi que les champs en remplissage libre ont été ajoutés tels quels dans le tableur.

#### *Résultats de laboratoire*

Les résultats obtenus à l'issue des analyses par le laboratoire ont été retranscrits tels quels dans le cas de paramètres quantitatifs, et codés en 0 et 1 pour absence et présence dans le cas des paramètres qualitatifs. Lors de la cytologie, si certaines cellules étaient présentes en trop faible quantité pour être quantifiées mais que le clinicien souhaitait indiquer leur présence, une valeur de 0,5% pour ou 0,2% était arbitrairement attribuée selon qu'elles étaient respectivement « rares » ou « très rares ».

### B. Outils graphiques

Les représentations graphiques des différents résultats exposées dans ce travail ont été réalisées à l'aide des logiciels Excel<sup>®</sup> et Word<sup>®</sup> du pack Office<sup>®</sup>.

### C. Outils statistiques

Les résultats statistiques présentés ont été interprétés soit directement sur Excel, soit à l'aide du logiciel R<sup>®</sup>. R<sup>®</sup> est un logiciel d'analyse statistique des données en libre accès, permettant de réaliser notamment des tests de corrélation, des tables de contingence, des régressions logistiques et les représentations graphiques associées.

Pour notre population d'étude, des statistiques descriptives sur Excel nous ont permis d'obtenir les moyennes, écart-types, minimums et maximums, pourcentages et effectifs, pour tous les paramètres étudiés. Les tests de corrélation et de mesure de l'accord ont été effectués sur R<sup>®</sup>.

La recherche de l'accord entre différents paramètres, comme la comparaison des méthodes et des sites de détection, a été faite à l'aide du coefficient Kappa de Cohen (**K**). Ce coefficient permet de mesurer le degré d'accord entre deux observateurs, ou deux méthodes différentes sur un paramètre dans le même échantillon. Sa valeur est comprise entre -1 et 1. Une valeur de -1 signe un désaccord parfait entre les deux méthodes, une valeur de 1 signe un accord parfait. La valeur 0 correspond à une absence d'accord : l'accord n'est pas meilleur que celui obtenu par le hasard. Le résultat est interprété selon une grille permettant de qualifier le résultat obtenu. Il n'existe pas de grille universelle. Nous avons choisi d'utiliser la grille de Landis et Koch, qui est souvent utilisée lors de tests à seulement deux paramètres comme dans notre étude. Cette grille est présentée ci-dessous (Tableau 9).

*Tableau 9 - Barème de Landis et Koch pour l'interprétation du coefficient Kappa de Cohen*

Valeur de K	Qualification de l'accord
0 – 0,2	Accord très faible
0,2 – 0,4	Accord faible
0,4 – 0,6	Accord moyen
0,6 – 0,8	Accord substantiel ou satisfaisant
0,8 - 1	Accord Excellent

Afin de tester le lien entre les différents facteurs environnementaux, les signes cliniques et les résultats cytologiques du cheval, et la présence d'éléments fongiques dans les voies respiratoires, des tests du Khi-deux ou de Fisher ont été réalisés. Si tous les effectifs du tableau de contingence étaient supérieurs à 5, un test du Khi-deux était réalisé. Sinon un test de Fisher était réalisé. Ces tests étaient réalisés sur le logiciel R. Une dépendance entre les deux variables était retenue lorsque la *p-value* du test (probabilité que le résultat soit lié au hasard) était inférieur à 0,05.

Enfin, afin de rechercher les facteurs de risque de la présence d'éléments fongiques dans les voies respiratoires du cheval, une régression logistique a également été réalisée. La régression étudie la relation de dépendance entre différentes variables explicatives, et une variable à prédire. Pour ce faire, chaque variable explicative est d'abord testée avec la variable à prédire. Les variables ayant un lien statistique de dépendance sont ensuite testées ensemble, afin de les hiérarchiser. Les variables retenues permettent alors de définir des facteurs de risque ou facteurs protecteurs concernant la réalisation ou non de la variable à prédire. Les odds ratio obtenus définissent le risque associé.



## II - Résultats

Cette étude a permis de constituer une population de 166 chevaux, dont 8 chevaux prélevés deux fois à plus d'un an d'intervalle, ayant ainsi permis d'obtenir 174 prélèvements différents. Sur ces 174 prélèvements initialement inclus, 3 ont dû être exclus pour des raisons de qualité. Ces derniers présentaient une trop grande altération, qui peut être lié à un délai d'acheminement trop long pour qu'une interprétation fiable puisse être réalisée. Finalement 171 prélèvements ont constitué la population décrite ci-dessous.

### 1. Description de la population d'étude

#### A. Âge

Dans notre étude, l'âge moyen des chevaux était de 8 ans, avec un écart-type de 5,3 ans, un minimum de 2 ans et un maximum de 25 ans.

La répartition des chevaux est fonction de l'âge et détaillée dans la figure 4.

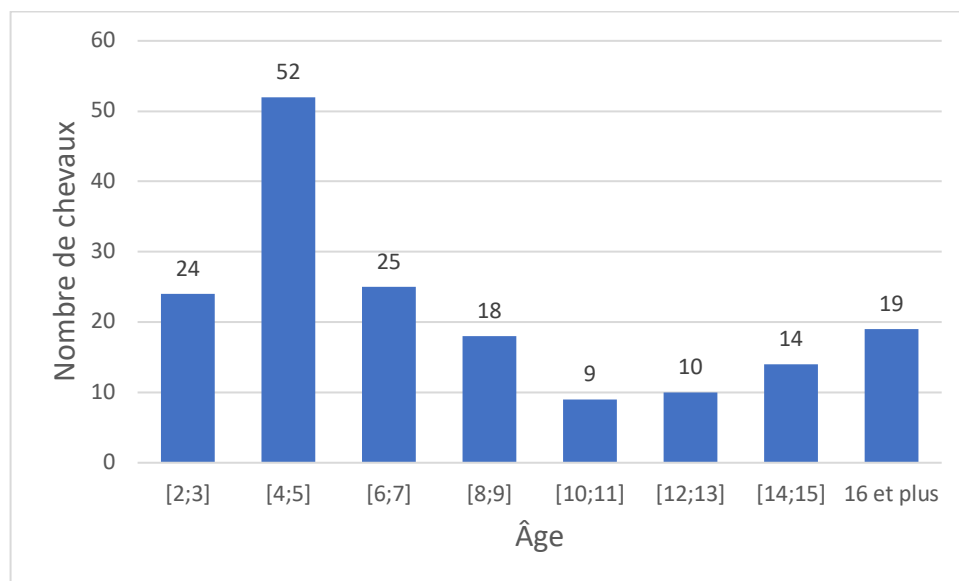


Figure 4 – Répartition du nombre de chevaux selon leur âge

#### B. Sexe

Sur les 171 chevaux inclus, la répartition des sexes était la suivante : 40 étaient des mâles, 66 des hongres et 65 des juments (Figure 5).

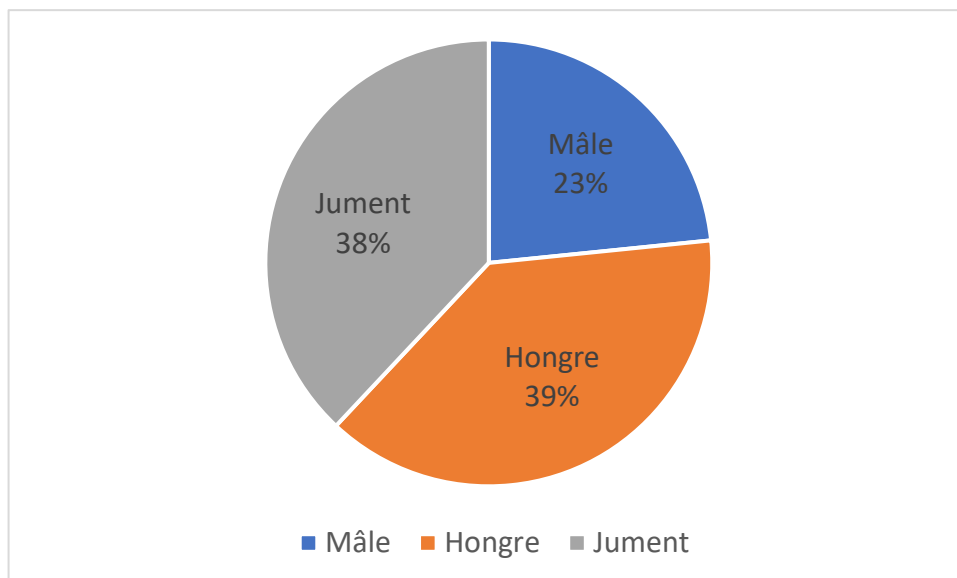


Figure 5 – Répartition des sexes dans la population exprimée en pourcentage

### C. Hébergement

L'hébergement des chevaux était soit en box strict, soit en extérieur strict (pré ou paddock) soit mixte, avec une alternance entre le box et le paddock.

22% (38/171) des chevaux étaient hébergés en box strict, 47% (80/171) en extérieur strict, et enfin 31% (53/171) avaient un hébergement mixte (Figure 6).

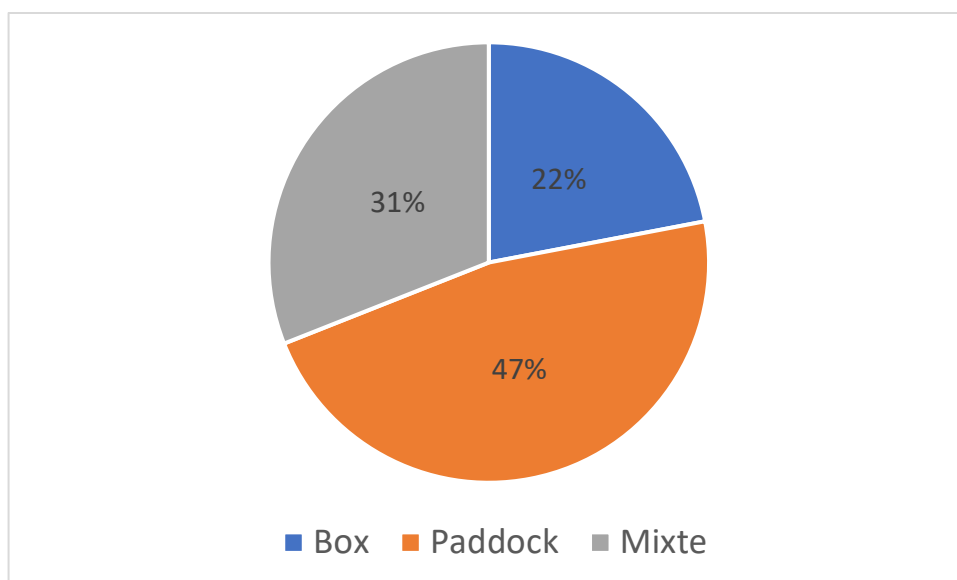


Figure 6 - Répartition des différents types d'hébergement dans la population

## D. Alimentation

### Foin

Concernant le foin, différentes possibilités étaient rapportées sur la fiche de renseignement : foin sec, trempé, stérilisé, et enfin enrubanné. Un total de 73% des chevaux était nourri avec du foin sec, contre 14% avec du foin trempé, 8% avec du foin stérilisé et enfin 5% avec de l'enrubanné (Figure 7).

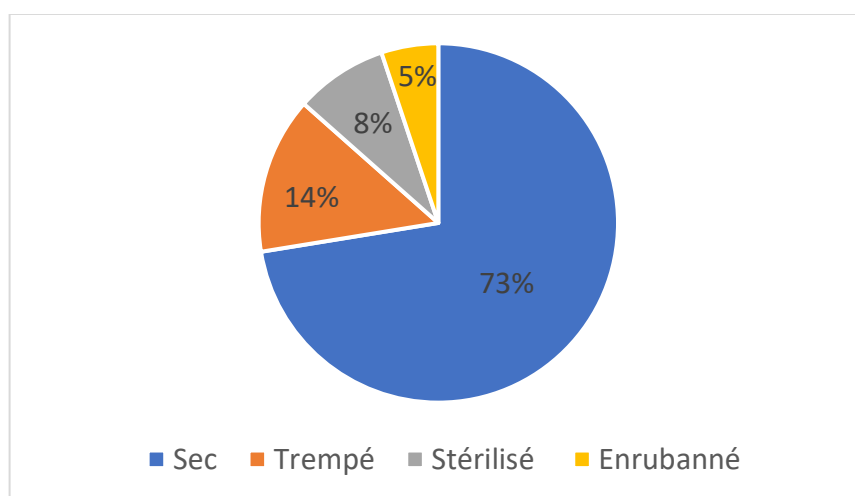


Figure 7 – Répartition des différents types de foin donnés aux chevaux

## E. Signes cliniques rapportés

Les signes cliniques rapportés étaient variables : dyspnée, toux, jetage, épistaxis, intolérance à l'effort et contre-performance étaient parmi les propositions sur la fiche de renseignements. Les signes les plus fréquemment rencontrés étaient le jetage (46%), la toux (41%), la dyspnée (31%), la dilatation des naseaux (22%), l'intolérance à l'effort (20%) ainsi que la contre-performance (13%) et l'épistaxis (3%).

La fréquence des signes cliniques rapportés est synthétisée dans la figure 8.

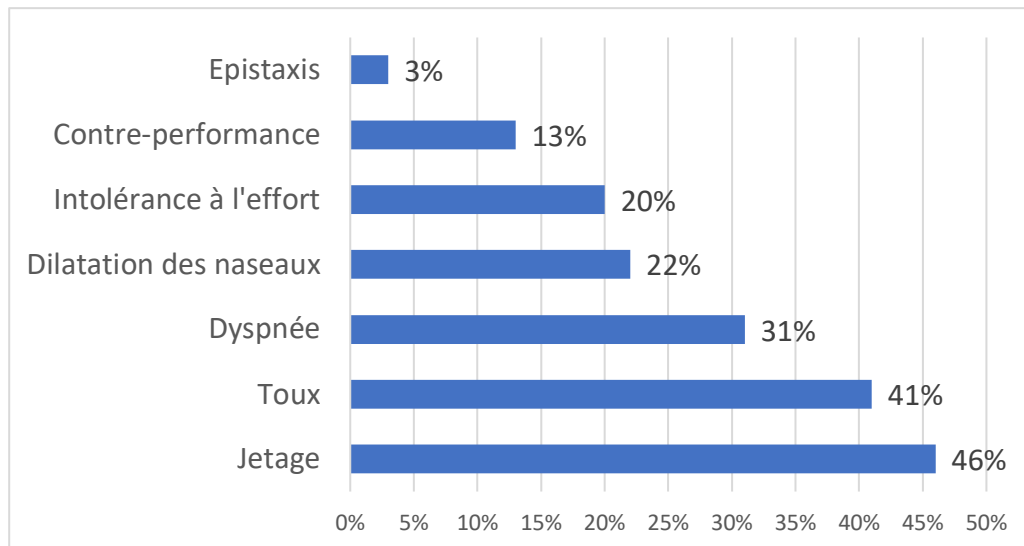


Figure 8 - Fréquence des signes cliniques rapportés dans la population

## F. Examen clinique

L'examen clinique réalisé sur les 171 chevaux a permis d'obtenir une note d'état corporel moyenne de 2,8/5 ( $\pm 0,6$ ), une température rectale moyenne de 37,3°C ( $\pm 0,5$ ), une fréquence cardiaque moyenne de 42 ( $\pm 7$ ) battements par minute et une fréquence respiratoire de 23 ( $\pm 10$ ) mouvements par minute.

Par ailleurs, les muqueuses étaient normales chez 89,5 % des chevaux examinés (153/171), pâles chez 6,5 % (11/171), et d'aspect congestif chez 4% (7/171) d'entre eux.

Les ganglions sous-mandibulaires n'étaient pas palpables chez 39,8% (68/171) des chevaux, palpables sans hypertrophie chez 48,5% (83/171) et hypertrophiés chez 11,8% (20/171). Ils étaient douloureux à la palpation chez 5% des chevaux (9/171).

La courbe respiratoire était anormale chez 48% des chevaux (67/140). Parmi ces derniers, 75% (50/67) présentaient une dyspnée expiratoire caractérisée par une « ligne de pousse », 16% (11/67) présentaient une dyspnée mixte inspiratoire (« tirage costal ») et expiratoire, et 9% (6/67) présentaient une polypnée superficielle.

## G. Test d'hyperventilation forcée

Le test d'hyperventilation forcée, couramment appelé « test au sac », a été réalisé sur 157 chevaux. En effet, il n'a pas pu être réalisé chez les chevaux peu coopératifs ou bien en dyspnée sévère.

Il a été bien toléré chez 89% des chevaux (139/157) et mal toléré chez 11% d'entre eux (18/157). Le temps de récupération était normal chez 59% des chevaux (92/157) et augmenté chez 41% (65/157).

La présence de crépitements ou de sifflements a également été notée : des crépitements étaient présents chez 60% des chevaux (94/157) et les sifflements chez 12% de la population (19/157). De même, la toux a été déclenchée chez 18% des chevaux (25/140) (Figure 9).

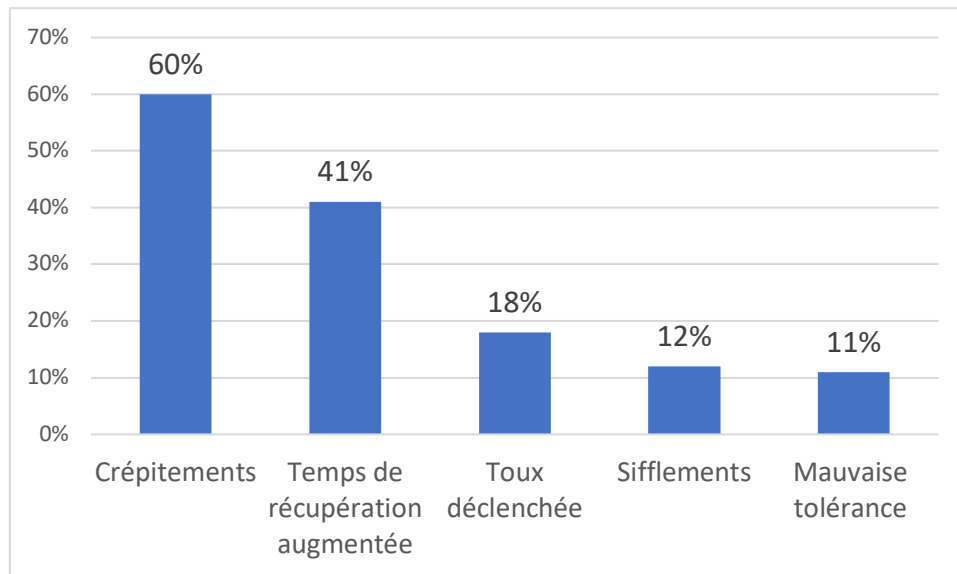


Figure 9 - Fréquence des différentes anomalies rencontrées lors du test au sac.

## H. Endoscopie

L'endoscopie réalisée dans cette étude a permis d'observer les cavités nasales, le pharynx et le larynx mais aussi les poches gutturales, ainsi que la trachée et les bronches principales.

Ainsi, certaines affections fréquemment rencontrées ont pu être décrites et gradées. C'est le cas de la pharyngite folliculaire hyperplasique, de l'hémiplégie laryngée récurrente, et de la présence de mucus trachéal.

### *Pharynx*

L'évaluation du pharynx a permis d'obtenir un grade moyen de pharyngite folliculaire hyperplasique de 1,7/4 ( $\pm 1,5$ ) sur les chevaux de l'étude. Les proportions des différents grades sont détaillées ci-dessous (Figures 10 et 11).

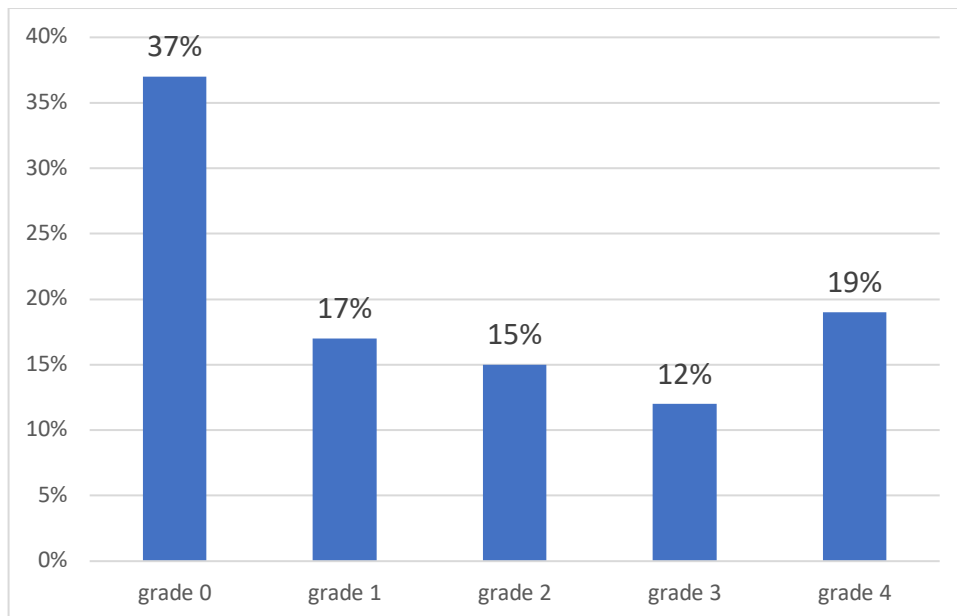


Figure 10 - Proportions des différents grades de pharyngite dans notre population

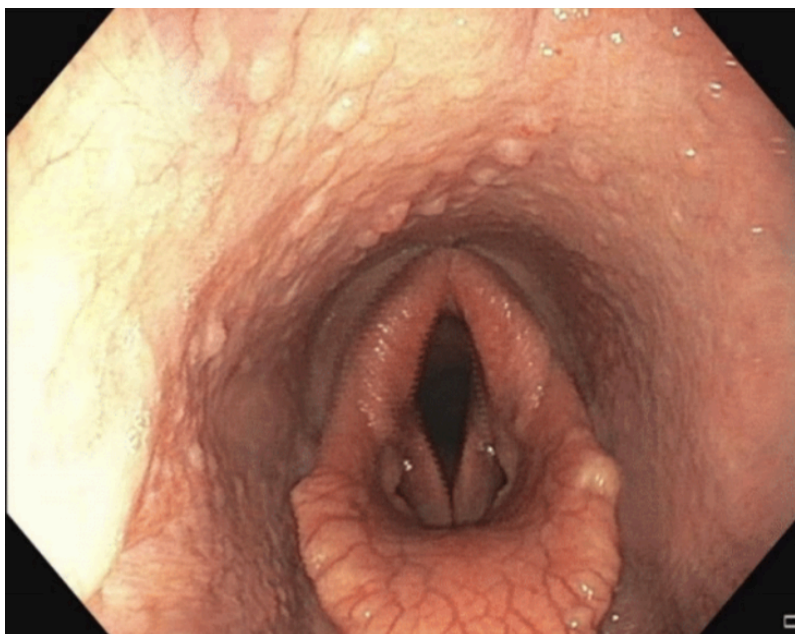


Figure 11 - Image endoscopique montrant une pharyngite folliculaire hyperplasique de grade 3 /4 (Crédit photo CISCO)

### Larynx

L'évaluation systématique du larynx a permis d'observer certaines anomalies : une hyperplasie lymphoïde est présente chez 6 chevaux sur 171 (3,5%) et une hémiplegie laryngée est mise en

évidence sur 6 chevaux également (3,5%). De même, deux chevaux présentaient un épaissement des cartilages du larynx, et un cheval présentait une chondrite du cartilage aryténoïde.

### *Poches gutturales*

Lors de l'observation des poches gutturales, différentes anomalies ont été rapportés. 25 prélèvements (14,6%) présentaient une hyperplasie lymphoïde. Des sécrétions purulentes étaient présentes dans 10 prélèvements (5,8%), des sécrétions muqueuses ou floconneuses dans 8 prélèvements (4,7%) et enfin des sécrétions mucopurulentes dans un seul prélèvement (0,6%). Des plagues de mycose des poches gutturales ont été observées chez un seul cheval (0,6%). Ces résultats sont présentés dans la figure 12.

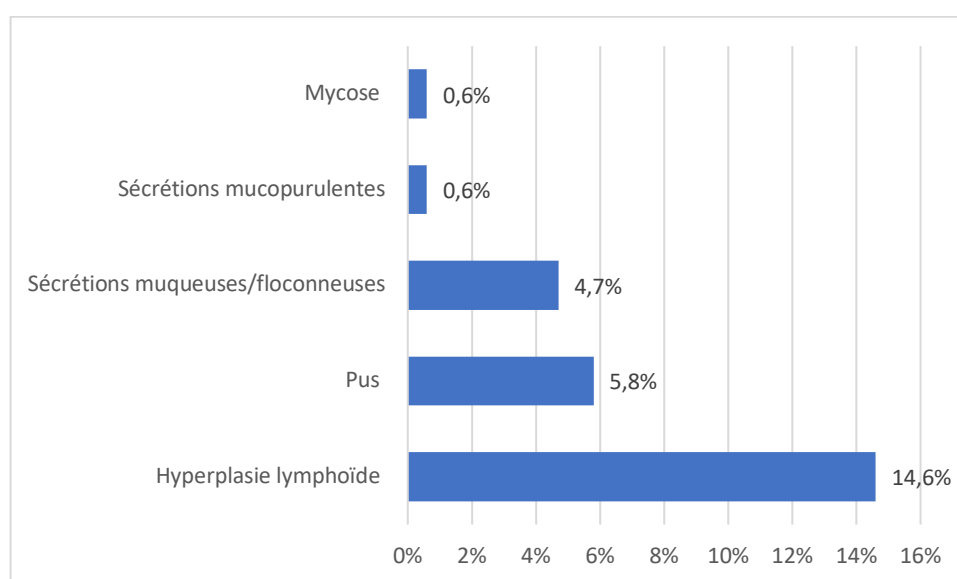


Figure 12 - Fréquence des différentes anomalies observées dans les poches gutturales

### *Mucus trachéal*

L'évaluation du score de mucus présent dans la trachée a permis d'attribuer une note gradée sur 5. Le grade moyen obtenu dans la population d'étude est de 1,7/5 (+/- 1,2). Les proportions des différents grades sont détaillées ci-dessous (Figures 13 et 14).

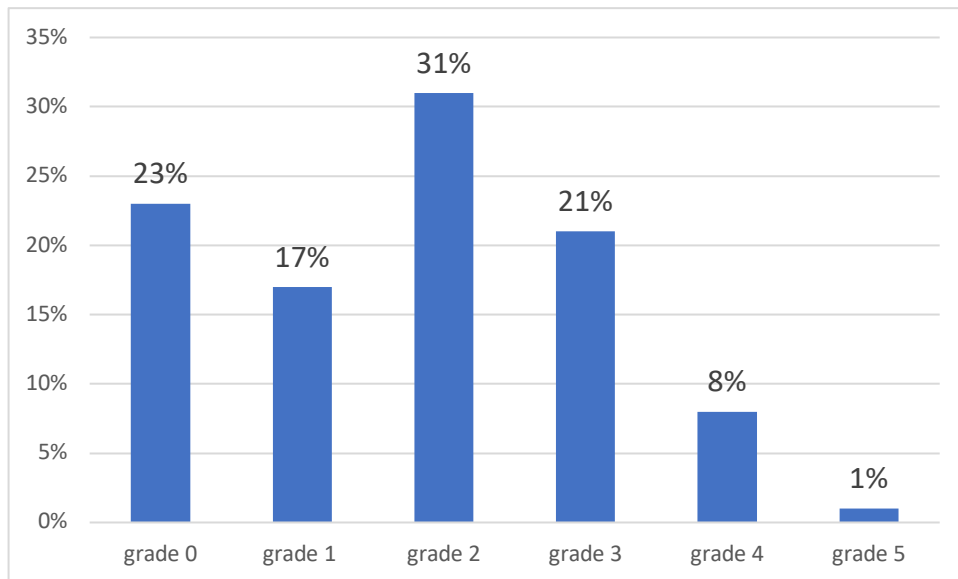


Figure 13 - Proportions des différents grades de mucus trachéal dans notre étude

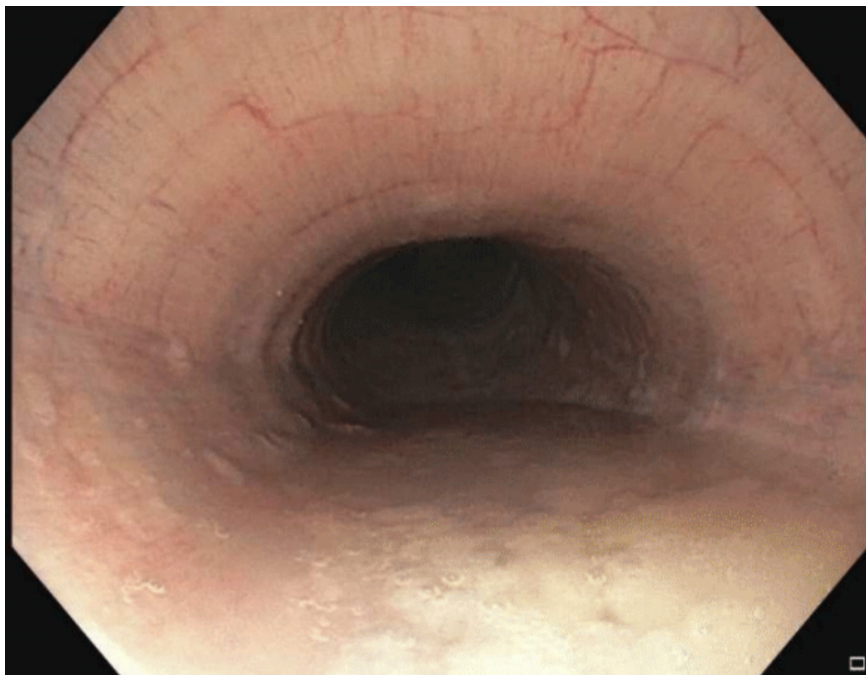


Figure 14 - Image endoscopique d'une trachée présentant un score de mucus trachéal de 5/5 (Crédit photo CISCO)

### I. Lavage des poches gutturales

Lors du lavage des poches gutturales, des prélèvements ont été réalisés dans les poches gutturales droite et gauche, avant d'être mis en commun pour les analyses. Les analyses sont donc toutes réalisées sur le mélange des lavages.



### Volumes récoltés

Le volume moyen récolté était de 30,8 ( $\pm$  8,3) mL pour la poche gutturale gauche et de 29,9 ( $\pm$  9,1) mL pour la poche gutturale droite. Les minimums et maximums sont respectivement de 4 et 53 mL à gauche et de 5 et 72 mL à droite.

### Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des prélèvements est rassemblé dans le tableau suivant (Tableau 10). Les prélèvements avaient majoritairement un aspect d'eau de roche ou translucide et étaient fluides. Concernant la couleur et la transparence, une seule réponse était possible, mais concernant la consistance, plusieurs réponses étaient possibles pour le même prélèvement.

Tableau 10 - Aspect macroscopique des lavages de poches gutturales ; couleur et transparence (en haut), consistance (en bas)

Aspect	Eau de roche	Translucide	Blanchâtre	Opalescent	Trouble
Nombre de prélèvements	130	33	1	6	1
Pourcentage de la population	76%	19,2%	0,6%	3,5%	0,6%

Aspect	Fluide	Légèrement muqueux	Muqueux	Légèrement floconneux	Floconneux
Nombre de prélèvements	160	5	2	10	6
Pourcentage de la population	93,6%	2,9%	1,2%	5,8%	3,5%

### Cytologie

L'analyse cytologique réalisée sur le mélange des lavages des poches gutturales a montré une grande variation dans les populations cellulaires mises en évidence.

Les cellules majoritaires étaient les cellules épithéliales, les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes (Tableau 11).

Les cellules épithéliales ciliées étaient présentes isolées dans 97,6% des prélèvements (167/171) et en amas dans 58,5% des prélèvements (100/171).

Tableau 11 - Proportion des différentes cellules dans le mélange des lavages des poches gutturales

	Neutrophiles	Macrophages	Lymphocytes
<b>Moyenne (%)</b>	22,1	4,3	3,7
<b>Minimum (%)</b>	0	0	0
<b>Maximum (%)</b>	95	73	35
<b>Ecart-type (%)</b>	35,2	9,3	7,1

Lors de l'examen cytologique, 9,4% des prélèvements (16/171) présentaient des neutrophiles dégénérés. Par ailleurs, des bactéries ont été mises en évidence dans 25,7% (44/171) des prélèvements. Un diagnostic d'inflammation des poches gutturales a été établi pour 29,2% (50/171) des chevaux.

#### Recherche d'éléments fongiques

Dans le mélange des lavages des poches gutturales, des éléments fongiques étaient présents dans 1,2% des prélèvements (2/171) lors de la cytologie.

#### Culture fongique

La culture fongique était positive pour 11 prélèvements sur 171, soit 6,4%. Les résultats des identifications sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 12).

Tableau 12 - Détails des identifications fongiques obtenues sur le prélèvement de mélange des lavages des poches gutturales

Identification	Nombre de prélèvements positifs
<i>Penicillium spp</i>	6
<i>Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger</i>	3
<i>Aspergillus glaucus, Chrysosporium spp, Cladosporium spp</i>	1

#### Recherche de gourme

Une recherche par PCR de l'agent de la gourme, *Streptococcus equi equi*, a également été réalisé. Elle s'est révélée positive chez 2 chevaux, soit 1,2% des prélèvements.

## J. Lavage trachéal

### *Volume récolté*

Lors du lavage trachéal, 40 mL ont été instillés à l'entrée de la trachée par le canal de l'endoscope. Le volume moyen réaspiré était de 27 mL ( $\pm 10$ ) avec un minimum de 5 mL et un maximum de 45 mL.

### *Aspect macroscopique*

La couleur, la transparence et la consistance du liquide de lavage obtenu ont été décrits. Celui-ci est normalement translucide et fluide. Concernant la couleur, une seule réponse était possible, mais concernant la consistance et la transparence, plusieurs réponses étaient possibles pour le même prélèvement. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 13).

*Tableau 13 - Aspect macroscopique des prélèvements de lavage trachéal (Couleur en haut, et transparence et consistance en bas)*

Aspect	Opalescent	Translucide	Blanchâtre	Beige	Jaunâtre	Rosé	Eau de roche	Verdâtre
Nombre de prélèvements	86	38	33	8	3	1	1	1
Pourcentage de la population	50,3%	22,2%	19,3%	4,7%	1,8%	0,6%	0,6%	0,6%

Aspect	Trouble	Fluide	Légèrement muqueux	Muqueux	Légèrement floconneux	Floconneux
Nombre de prélèvements	39	34	15	79	21	32
Pourcentage de la population	22,8%	19,9%	8,8%	46,2%	12,3%	18,7%

### *Cytologie*

La cytologie était lue soit sur un étalement direct, soit sur une concentration des cellules, selon l'abondance cellulaire du prélèvement. Les types cellulaires les plus fréquemment rencontrés et leurs proportions sont synthétisés dans le tableau suivant (Tableau 14).

Tableau 14 - Pourcentages des populations cellulaires dans le lavage trachéal

	Neutrophiles	Eosinophiles	Lymphocytes	Macrophages	Hémosidérophages
<b>Moyenne (%)</b>	57,1	0,8	13,8	25,9	1,1
<b>Minimum (%)</b>	0,5	0	0	0	0
<b>Maximum (%)</b>	98	13	32	78	35
<b>Ecart-type (%)</b>	26,2	1,9	8,2	20	4

Un cytodagnostic d'inflammation trachéale (SIT) a été établi pour 91,8% (156/170) de la population d'étude. Plus précisément, 39,4% (67/170) des chevaux présentaient notamment une inflammation trachéale sévère (plus de 70% de PN).

Lors de l'examen cytologique, des bactéries ont été mises en évidence par observation directe, libres, phagocytées ou recouvrant les cellules épithéliales malpighiennes.

Des bactéries libres ont été observées chez 36,8% des chevaux (63/171), les bactéries phagocytées chez 6,4% des chevaux (11/171), et enfin, les bactéries liées aux cellules épithéliales chez 33,3% (57/171).

#### *Recherche d'éléments fongiques*

Des éléments fongiques ont également pu être visualisés par cytologie, aussi bien des spores, que des hyphes, libres ou phagocytés.

Au total, 76,6% (131/171) des chevaux présentaient des éléments fongiques libres dans la cytologie. Parmi ceux-là, 67,2% (88/131) présentaient également des éléments fongiques phagocytés.

Il s'agissait soit de spores, soit d'hyphes, soit des deux réunis dans le même prélèvement.

#### *Culture bactériologique*

Les cultures bactériologiques réalisées sur les lavages trachéaux se sont révélées positives chez 21,1% des prélèvements (36/171). Par ailleurs, dans 14,6% (25/171) des prélèvements, l'identification n'était pas réalisée, du fait d'une flore polymorphe, sans prédominance de germe, résultant probablement d'une contamination.

Les différents germes identifiés sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 15).

Tableau 15 - Les différents germes identifiés par culture sur le lavage trachéal

Identification	Nombre de prélèvements positifs
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	14
<i>Streptococcus alpha hémolytique</i>	9
<i>Psychobacter phenylpyruvica</i>	6
<i>Pseudomonas spp, Actinobacillus spp haemolyticus</i>	5
<i>Pasteurella spp</i>	4
<i>Pantoea spp</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae, Streptococcus spp non hémolytique, Stenotrophomas maltophilia, Bacilles Gram -</i>	2
<i>Acinetobacter pseudolwoffii, Acinetobacter spp, Aeromonas spp, Aeromonas salmonicida, Citrobacter gilleni, Bordetella bronchiseptica, Enterococcus spp, Moraxella spp, Pantoea agglomerans, Pseudomonas aeruginosa, Raoultella spp, Staphylococcus xylosus, Streptococcus fécal</i>	1

### Culture fongique

La culture fongique a été positive chez 82,5% (141/171) des prélèvements de lavage trachéal, et a permis d'obtenir l'identification de toutes les colonies qui ont poussé. Ces colonies ont été identifiées par genre ou pour certains genres par espèce. Le recensement des colonies est détaillé dans le tableau suivant (Tableau 16). Les genres les plus représentés sont *Aspergillus* avec 119 identifications, *Penicillium* avec 73 identifications et enfin *Chrysosporium* avec 46 identifications.

Tableau 16 - Détails des identifications fongiques obtenues sur le prélèvement de lavage trachéal

Identification	Nombre de prélèvements positifs
<i>Penicillium spp</i>	73
<i>Chrysosporium spp</i>	46
<i>Aspergillus nidulans</i>	40
<i>Aspergillus fumigatus</i>	33
<i>Aspergillus niger</i>	16
<i>Aspergillus glaucus</i>	15
<i>Cladosporium spp</i>	13
<i>Alternaria spp</i>	12
<i>Mucor spp</i>	9
<i>Aspergillus terreus</i>	7
<i>Aspergillus versicolor</i>	6
<i>Scedosporium spp</i>	3
<i>Acremonium spp, Aspergillus flavus, candida famata, candida sp, Tricothécium spp</i>	2
<i>Beauveria spp, Botrytis spp, Candida guilliermondi, Cryptococcus laurenti, geotrichum spp, Paecilomyces, Trichoderma spp</i>	1

#### Recherche de mycoplasmes

Une recherche bactériologique par PCR des mycoplasmes a également été réalisée sur les prélèvements de liquide trachéal. Des mycoplasmes ont été identifiés dans 40,1% des prélèvements (68/168).

#### Recherche de virus respiratoires

Le prélèvement de lavage trachéal a permis de rechercher la présence de virus responsables de maladies respiratoires, par PCR. Les virus recherchés sont la grippe (EIV), les *Herpèsvirus* équins (EHV) de type 1, 2, 4 et 5, l'*adénovirus 1* et les *rhinovirus A et B*.

Les pourcentages de prélèvements positifs sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 17).

Tableau 17 - Recherche de virus respiratoires par PCR

Virus recherché	Prélèvement positifs
Grippe (EIV)	0% (0/168)
EHV 1	0% (0/168)
EHV 2	33,9 % (54/168)
EHV 4	1,2 % (2/168)
EHV 5	39,9% (67/168)
Adénovirus 1	1,2% (2/168)
Rhinovirus A	0% (0/168)
Rhinovirus B	39,3 % (66/168)

#### K. Lavages broncho-alvéolaires

Les lavages bronchoalvéolaires ont été réalisés dans les poumons droit et gauche, et un mélange au prorata des volumes récupérés a aussi été constitué. Un examen cytologique a été réalisé sur les 3 prélèvements, et une culture fongique uniquement sur le mélange des lavages.

##### *Volumes récoltés*

Lors de chaque lavage, deux fois 250 mL de solution physiologique tiédi ont été injectés dans les poumons, soit 500 mL par poumon. Les volumes récoltés lors des lavages broncho-alvéolaires ont été notés sur la fiche de renseignements. Ces données sont synthétisées dans le tableau suivant (Tableau 18).

Tableau 18 - Volumes récoltés lors des lavages broncho-alvéolaires droit et gauche

	Poumon droit	Poumon gauche
<b>Moyenne</b>	218 mL	241 mL
<b>Ecart-type</b>	63 mL	77 mL
<b>Minimum</b>	41 mL	50 mL
<b>Maximum</b>	363 mL	448 mL

### Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des prélèvements a été décrit ; il est normalement translucide et fluide. Les aspects de différents prélèvements sont rassemblés dans les tableaux suivants (Tableaux 19 et 20). Concernant la couleur, une seule réponse était possible, mais concernant la transparence et la consistance, différents choix de réponse étaient possibles.

Tableau 19 - Aspect macroscopique (couleur) des lavages broncho-alvéolaires

		Eau de roche	Translucide	Rosé	Jaunâtre	Opalescent
<b>LBA mélange</b>	Effectif	3	128	3	14	23
	%	1,8%	74,9%	1,8%	8,2%	13,5%
<b>LBA droit</b>	Effectif	4	135	3	10	19
	%	2,3%	78,9%	1,8%	5,8%	11,1%
<b>LBA gauche</b>	Effectif	3	135	2	11	20
	%	1,8%	78,9%	1,2%	6,4%	11,7%

Tableau 20 - Aspect macroscopique (transparence et consistance) des lavages broncho-alvéolaires

		Trouble	Fluide	Légèrement muqueux ou muqueux	Légèrement floconneux ou floconneux	Floculats
<b>LBA mélange</b>	Effectif	2	146	10	35	0
	%	1,2%	85,4%	5,8%	20,5%	0%
<b>LBA droit</b>	Effectif	0	150	7	34	0
	%	0%	87,7%	4,1%	19,9%	0%
<b>LBA gauche</b>	Effectif	1	150	11	28	1
	%	0,6%	87,7%	6,4%	16,4%	0,6%

### Cytologie

L'examen cytologique a été réalisé sur le mélange des lavages broncho-alvéolaires ainsi que sur les lavages broncho-alvéolaires gauche et droit. Les populations cellulaires les plus fréquemment rencontrées sont les neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages, les lymphocytes, les mastocytes et les hémosidérocytes. Leurs proportions dans les différents prélèvements sont rassemblées dans le tableau suivant (Tableau 21).



Tableau 21 - Proportions cellulaires des différents prélèvements de lavages broncho-alvéolaires (L = lymphocytes, Macro = macrophages, H = hémosidérophages, Masto = mastocytes)

		PN	PE	L	Macro	H	Masto
<b>LBA mélange</b>	Moyenne (%)	15,1	0,5	37,4	42,2	2,1	2,6
	Minimum (%)	1	0	4	3	0	0
	Maximum (%)	93	20	74	72	37	11
	Ecart-type (%)	18,4	1,7	11,4	13,8	5,2	1,8
<b>LBA droit</b>	Moyenne (%)	14,8	0,6	36,3	41,9	2,6	2,6
	Minimum (%)	0	0	0	0	0	0
	Maximum (%)	92	25	80	72	45	12
	Ecart-type (%)	17,8	2,1	11,6	14,2	7,1	2,1
<b>LBA gauche</b>	Moyenne (%)	14,6	0,6	36,9	43,1	1,4	2,7
	Minimum (%)	0	0	0,2	0	0	0
	Maximum (%)	92	47	71	70	34	11
	Ecart-type (%)	18,7	3,8	11,6	14,5	4,6	1,9

Des bactéries, libres ou phagocytées, et des hématies, libres ou phagocytées, ont pu être observées, ainsi que des spirales de Curshmann, dans les différents prélèvements. Les spirales de Curshmann sont des enroulements de cellules épithéliales autour de bouchons de mucus, qui obstruent les bronchioles. Ces figures sont fortement évocatrices d'asthme équin. Ces données sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (Tableau 22).

Tableau 22 - Proportion des bactéries, hématies et spirales de Curshmann observées dans la cytologie des LBA

		LBA <sub>d</sub>	LBA <sub>g</sub>	LBA <sub>m</sub>
<b>Bactéries</b>	Libres	10 (5,8%)	5 (2,9%)	8 (4,7%)
	Phagocytées	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,6%)
<b>Hématies</b>	Libres	117 (68,4%)	121 (70,8%)	121 (70,8%)
	Phagocytés	15 (8,8%)	12 (7,0%)	16 (9,4%)
<b>Spirales de Curshmann</b>		9 (5,3%)	1 (0,6%)	6 (3,5%)

L'analyse de ces prélèvements a permis d'établir un cytodiagnostics d'asthme équin modéré pour 68 prélèvements (40,4%), d'asthme équin sévère pour 30 prélèvements (17,5%), et enfin d'hémorragie

pulmonaire induite à l'exercice pour 15 chevaux (8,8%), selon les valeurs seuils précisées dans le Tableau 4.

### Recherche d'éléments fongiques

La recherche des éléments fongiques sur la cytologie a été réalisée sur le mélange des lavages ainsi que sur les lavages droit et gauche. Les pourcentages de prélèvements contenant des éléments fongiques, parmi lesquels les spores et les hyphes, sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 23).

Tableau 23 - Pourcentage de présence d'éléments fongiques dans la cytologie des lavages broncho-alvéolaires

	Éléments fongiques	Spores	Hyphes
<b>LBA Mélange</b>	20,5% (35)	20,5% (35)	9,4% (16)
<b>LBA Droit</b>	26,9% (46)	24,6% (42)	15,8% (27)
<b>LBA Gauche</b>	25,7% (44)	25,7% (44)	9,4% (16)

### Culture fongique

Parallèlement, une culture fongique a été réalisée sur le mélange des lavages broncho-alvéolaires. Un résultat positif a été obtenu pour 22,8% des prélèvements, soit 39 chevaux sur 171. Une identification du genre et de l'espèce pour certains genres a été réalisée. Le genre le plus représenté était *Aspergillus*.

Les résultats des identifications sont présentés ci-dessous (Tableau 24).

Tableau 24 - Détails des identifications fongiques obtenues sur le prélèvement de mélange des lavages broncho-alvéolaires

Identification	Nombre de prélèvements positifs
<i>Aureobasidium pullulans</i>	10
<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Penicillium spp</i>	8
<i>Aspergillus glaucus</i>	7
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Chrysosporium spp</i> , <i>Candida albicans</i>	3
<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Scedosporium spp</i>	2
<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Alternaria spp</i> , <i>Geotrichum spp</i>	1

## 2. Prévalence des éléments fongiques dans les voies respiratoires

### A. Lavages des poches gutturales

Dans le mélange des lavages des poches gutturales, des éléments fongiques étaient présents dans 1,2% des prélèvements (2/171) lors de la cytologie, et la culture fongique était positive pour 11 prélèvements sur 171, soit 6,4%. Pour un cheval, la culture et la cytologie étaient positives. Pour 159 chevaux, la culture et la cytologie étaient négatives. En revanche, un prélèvement était positif en cytologie et présentait une culture négative et 10 étaient négatifs lors de la cytologie mais présentaient une culture positive. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 25).

Tableau 25 - Table de contingence entre la culture et la cytologie du mélange des lavages des poches gutturales

		Cytologie		Total
		Négatif	Positif	
Culture	Négatif	<b>159</b> (93,0%)	<b>1</b> (0,6%)	<b>160</b> (93,6%)
	Positif	<b>10</b> (5,8%)	<b>1</b> (0,6%)	<b>11</b> (6,4%)
Total		<b>169</b> (98,8%)	<b>2</b> (1,2%)	<b>171</b> (100%)

Lors de la cytologie, les éléments fongiques observés étaient des spores libres et phagocytés pour un prélèvement et des hyphes libres pour le second.

### B. Lavage trachéal

Dans le lavage trachéal, 131 prélèvements (76,6%) étaient positifs lors de la cytologie, et 141 (82,5%) étaient positifs lors de la culture fongique.

Sur les 171 prélèvements, 112 (65,5%) étaient positifs pour les deux méthodes, et 11 (6,4%) étaient négatifs pour ces deux méthodes également. En revanche, 29 prélèvements, soit 17,0% de la population, se sont révélés positifs lors de la culture fongique mais présentaient une cytologie négative. De même, 19 prélèvements (11,1%) présentaient des éléments fongiques visibles en cytologie, mais une culture négative. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 26). Ainsi, toutes méthodes confondues, des éléments fongiques étaient présents dans 93,6% des prélèvements de lavage trachéal, soit 160 chevaux dans notre population d'études.

Tableau 26 - Table de contingence entre la culture et la cytologie du lavage trachéal

		Cytologie		Total
		Négatif	Positif	
Culture	Négatif	11 (6,4%)	19 (11,1%)	30 (17,5%)
	Positif	29 (17,0%)	112 (65,5%)	141 (82,5%)
Total		40 (23,4%)	131 (76,6%)	171 (100%)

Par ailleurs, lors de l'examen cytologique, les éléments fongiques visualisés étaient soit libres (131, soit 100% des prélèvements positifs) soit phagocytés, dans 67,2% des cas. Des spores libres ont été observées dans 88,6% des prélèvements positifs, et dans 63,4% de ces derniers, elles étaient phagocytées. Des hyphes libres ont été visualisés dans 74,8% des prélèvements positifs, et phagocytés dans 45,8% (Tableau 27).

Tableau 27 - Pourcentage des différents éléments fongiques visualisés lors de la cytologie dans le lavage trachéal

	Éléments fongiques	Spores	Hyphes
Libres	100% (131)	88,6% (116)	74,8% (98)
Phagocytés	67,2% (88)	63,4% (83)	45,8% (60)

### C. Lavages broncho-alvéolaires

Sur les prélèvements de mélange des lavages broncho-alvéolaires, 35 chevaux ont présenté des éléments fongiques à la cytologie, soit 20,5% et 39 ont eu une culture fongique positive, soit 22,8%. Pour 10 prélèvements (5,8%), la culture et la cytologie étaient positives, et pour 107 prélèvements (62,6%), la culture et la cytologie se sont révélées négatives. En revanche, 29 chevaux (17,0%) ont eu une culture positive sans éléments fongiques visibles en cytologie, et 25 chevaux (14,6%) se sont révélés positifs lors de la cytologie, en ayant une culture négative. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 28). Ainsi, toutes méthodes confondues, des éléments fongiques ont été mis en évidence chez 37,4 % des prélèvements de mélange des lavages broncho-alvéolaires, soit 64 chevaux.

Tableau 28 - Table de contingence entre la culture et la cytologie du mélange des lavages broncho-alvéolaires

		Cytologie		Total
		Négatif	Positif	
Culture	Négatif	<b>107</b> (62,6%)	<b>25</b> (14,6%)	<b>132</b> (77,2%)
	Positif	<b>29</b> (17,0%)	<b>10</b> (5,8%)	<b>39</b> (22,8%)
Total		<b>136</b> (79,6%)	<b>35</b> (20,5%)	<b>171</b> (100%)

Par ailleurs, lors de l'examen cytologique, les éléments fongiques visualisés étaient soit libres (35, soit 100% des prélèvements positifs) soit phagocytés, dans 88,6% des cas. Des spores libres ont été observées dans 100% des prélèvements positifs, et dans 88,6% de ces derniers, elles étaient phagocytées. Des hyphes libres ont été visualisés dans 45,7% des prélèvements positifs, et phagocytés dans 42,9% (Tableau 29).

Tableau 29 - Pourcentage des différents éléments fongiques visualisés lors de la cytologie du mélange des lavages broncho-alvéolaires

	Éléments fongiques	Spores	Hyphes
Libres	100% (35)	100% (35)	45,7% (16)
Phagocytés	88,6% (31)	88,6% (31)	42,9% (15)

Les prévalences de détection des éléments fongiques dans les différents prélèvements sont rassemblées en Figure 15, ainsi que leur intervalle de confiance à 95%. Celles-ci, ne sont pas significativement différentes entre la culture et la cytologie du lavage trachéal, entre la culture et la cytologie du mélange des lavages broncho-alvéolaires et entre les cytologies des LBA gauche, droit, et mélangé. En revanche, elles sont significativement supérieures dans le lavage trachéal, dans le lavage broncho-alvéolaire, aussi bien en cytologie qu'en culture.

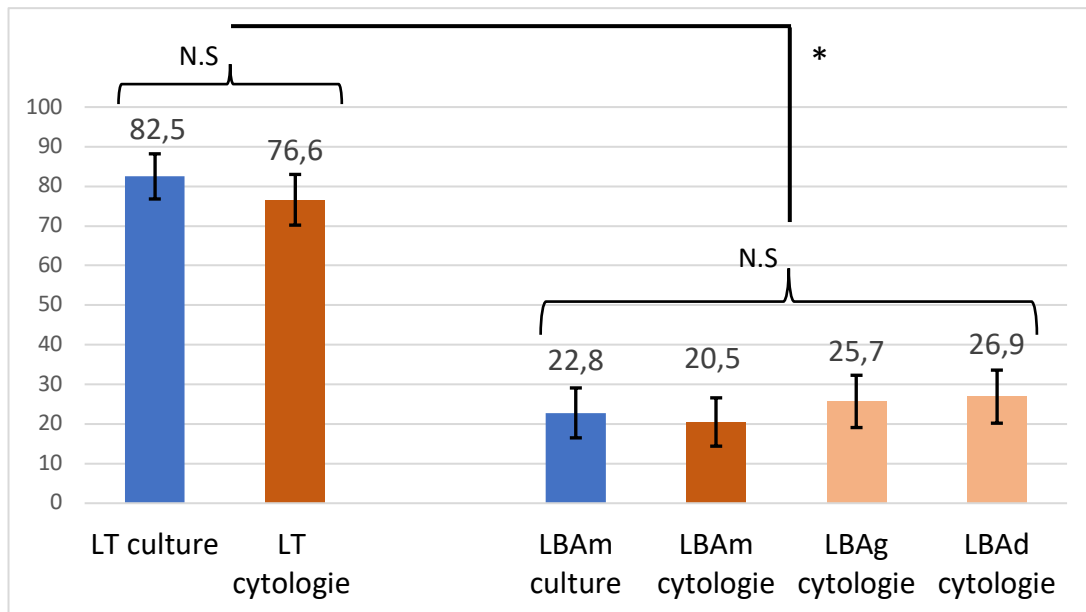


Figure 15 - Prévalence de détection des éléments fongiques dans les différents prélèvements respiratoires (N.S = non significatif, \* = significativement différent)

### 3. Comparaison des méthodes de détection des éléments fongiques

Afin de mesurer l'accord entre la culture et la cytologie des prélèvements respiratoires, le coefficient Kappa de Cohen (**K**) a été calculé entre la culture et la cytologie pour le mélange des lavages des poches gutturales, pour le lavage trachéal et enfin pour le mélange des lavages broncho-alvéolaires (Tableau 30).

Tableau 30 - Recherche de l'accord entre la culture fongique et la cytologie dans les différents prélèvements respiratoires

	<b>K</b>	Intervalle de Confiance
Mélange des lavages des poches gutturales	<b>0,14</b>	+/- 0,26
Lavage trachéal	<b>0,14</b>	+/- 0,17
Mélange des lavages broncho-alvéolaires	<b>0,07</b>	+/- 0,16

Quel que soit le type de prélèvement concerné, l'accord entre la culture et la cytologie était très faible.

### 4. Comparaison des sites de détection

Afin de comparer maintenant l'accord entre les cytologies des lavages broncho-alvéolaires gauche, droit et mélangés, et entre le lavage trachéal et le mélange des LBA, le coefficient Kappa de Cohen a été calculé.

## A. Comparaison des prélèvements de lavage broncho-alvéolaires

Concernant l'accord entre les LBA gauche et mélange et entre les LBA droit et mélange, l'accord a pu être qualifié de satisfaisant et il était moyen entre les LBA gauche et droit (Tableau 31).

Tableau 31 - Recherche de l'accord entre les cytologies des prélèvements de LBA

	<b>K</b>	Intervalle de Confiance
LBAg - LBAm	<b>0,66</b>	+/- 0,14
LBAAd - BAm	<b>0,66</b>	+/- 0,14
LBAg - LBAAd	<b>0,52</b>	+/- 0,14

## B. Comparaison du lavage trachéal et du mélange des LBA

Entre le LT et le LBA, que ce soit en culture comme en cytologie, l'accord calculé était très faible entre les deux sites de prélèvements (Tableau 32).

Tableau 32 - Recherche de l'accord entre le LT et le LBAm, en culture et en cytologie

	<b>K</b>	Intervalle de Confiance
Cytologie LT – Cytologie LBAm	<b>0,13</b>	+/- 0,07
Culture LT – Culture LBAm	<b>0,10</b>	+/- 0,06

## 5. Comparaison des éléments fongiques dans les voies respiratoires et dans le foin

Parallèlement aux prélèvements et analyses respiratoires, un prélèvement de foin était réalisé afin de dénombrer la flore aérobie totale, ainsi que d'identifier les moisissures et levures présentes. Ces prélèvements étaient réalisés uniquement lors de l'examen des trotteurs français sur le terrain. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 33). Le nombre de chevaux correspond au nombre de prélèvements pour lesquels au moins une espèce de champignon était également retrouvée dans les voies respiratoires (culture fongique sur le lavage trachéal ou le lavage broncho-alvéolaires). Les données récoltées regroupent 59 chevaux, et 11 prélèvements de foin, prélevés dans 4 écuries différentes (A à D).

Tableau 33 - Dénombrement et identification des moisissures dans le foin

Écurie	Levures (colonies/g)	Moisissures (colonies/g)	Identification	Nombre de chevaux ayant des éléments fongiques en commun avec le foin		Nombre de chevaux prélevés
				LT	LBA	
A	53 000	8 000	<i>Mucor, Alternaria, Penicillium, Rhodotorula</i>	5	0	6
A	1 300	3 000	<i>Mucor, Alternaria, Penicillium,</i>	3	1	6
B	4 900	3 400	<i>Cladosporium, Fusarium, Ulocladium</i>	0	0	6
C	<10	750	<i>Mucor, Chrysosporium, Cladosporium, Penicillium, Aspergillus niger</i>	5	0	6
A	<10	5 500	<i>Mucor, Alternaria, Chrysosporium, Aspergillus versicolor</i>	3	0	6
B	8 000	63 000	<i>Mucor, Alternaria</i>	0	1	6
C	8 700	2 400	<i>Alternaria, Chrysosporium, Cladosporium, Penicillium</i>	4	1	6
A	<10	66 000	<i>Mucor, Cladosporium</i>	0	0	6
D	29 000	45 000	<i>Mucor, Alternaria, Chrysosporium, Cladosporium, Penicillium, Geotrichum</i>	1	0	2
D	600 000	2 000 000	<i>Mucor, Alternaria, Chrysosporium, Cladosporium, Penicillium</i>	2	0	3
D	200 000	600 000	<i>Mucor, Trichoderma</i>	0	0	6



La flore fongique totale, constituée par la somme des levures et moisissures, était en moyenne de 316 000 colonies par gramme, avec un écart-type de 758 000 colonies par gramme.

Ainsi, 37,3% des chevaux (22/59) avaient au moins une moisissure commune entre la culture du lavage trachéal et le foin. 19 d'entre eux avaient une seule moisissure commune, et 3 d'entre eux avaient deux champignons communs dans le lavage trachéal.

Par ailleurs, 5,1% des chevaux (3/59) avaient une moisissure commune entre la culture du mélange des lavages broncho-alvéolaires et le foin.

## 6. Recherche de corrélations entre la présence d'éléments fongiques et l'hébergement, l'alimentation et les signes cliniques rapportés.

### A. Éléments fongiques et environnement des chevaux

Dans notre étude, les chevaux étaient logés soit en box, soit en pâture, soit dans une combinaison des deux. La litière utilisée était soit de la paille, soit des copeaux. Enfin le type de foin donné aux chevaux était renseigné : les différentes possibilités étaient du foin sec, du foin trempé, du foin stérilisé et du foin enrubanné. Ces données, renseignées dans la feuille de commémoratifs et anamnèse, ont été utilisées afin de rechercher une corrélation statistique entre ces différents facteurs environnementaux et la présence d'éléments fongiques dans le lavage trachéal et le lavage broncho-alvéolaire. Un test du Chi-deux d'indépendance ou de Fisher était donc réalisé selon les effectifs obtenus.

### Lavage trachéal

Concernant le logement, être logé en box était associé à un risque significativement plus élevé d'avoir une culture positive. Une litière en copeaux était également associée à un risque plus faible d'avoir une culture positive (Tableau 34).

L'alimentation du cheval avec du foin trempé était associée à un risque réduit d'avoir des éléments fongiques visibles en cytologie du lavage trachéal ainsi que d'avoir une culture fongique positive, au risque d'erreur de 5%.

Tous les autres facteurs environnementaux n'ont pas permis de montrer un lien statistique avec les éléments fongiques trachéaux.

Tableau 34 - Recherche d'associations entre l'environnement et les éléments fongiques dans le lavage trachéal

	Cytologie		Culture fongique	
	P-value	Test	P-Value	Test
Logement en pâture	1	Khi-deux	1	Khi-deux
Logement en box	1	Khi-deux	<b>0,028</b>	Fisher
Logement mixte	1	Khi-deux	0,068	Khi-deux
Litière de paille	0,23	Khi-deux	0,46	Khi-deux
Litière de copeaux	0,07	Fisher	<b>0,014</b>	Fisher
Foin sec	0,96	Khi-deux	0,34	Khi-deux
Foin trempé	<b>0,018</b>	Khi-deux	<b>0,030</b>	Fisher
Foin stérilisé	0,52	Fisher	0,47	Fisher
Foin enrubanné	0,39	Fisher	0,15	Fisher

### *Lavage broncho-alvéolaire*

Aucune association statistique n'a pu être mise en évidence entre la présence d'éléments fongiques dans le mélange des lavages broncho-alvéolaires et les facteurs environnementaux comme l'hébergement, la litière et le type de foin (Tableau 35).

*Tableau 35 - Recherche d'associations entre l'environnement et les éléments fongiques dans le mélange des lavages broncho-alvéolaires*

	Cytologie		Culture fongique	
	P-value	Test	P-Value	Test
<b>Logement en pâture</b>	0,74	Khi-deux	0,42	Khi-deux
<b>Logement en box</b>	0,96	Khi-deux	0,79	Khi-deux
<b>Logement mixte</b>	0,58	Khi-deux	0,82	Khi-deux
<b>Litière de paille</b>	0,46	Khi-deux	0,25	Khi-deux
<b>Litière de copeaux</b>	0,53	Fisher	1	Fisher
<b>Foin sec</b>	1	Khi-deux	0,87	Khi-deux
<b>Foin trempé</b>	0,57	Fisher	0,79	Khi-deux
<b>Foin stérilisé</b>	0,74	Fisher	0,53	Fisher
<b>Foin enrubanné</b>	0,67	Fisher	0,20	Fisher

## B. Éléments fongiques et signes cliniques rapportés

Les signes cliniques renseignés par l'entraîneur ou le propriétaire étaient rassemblés sur la feuille de commémoratifs et anamnèse. Une corrélation est recherchée avec la présence d'éléments fongiques dans le LT et le LBA.

### *Lavage trachéal*

Les tests du chi-deux réalisés permettent d'établir un lien statistique entre la cytologie du lavage trachéal et une dyspnée, de la toux, et la dilatation des naseaux. Ces trois facteurs étaient associés à un risque significativement plus faible d'avoir des éléments fongiques observés en cytologie.

Aucun lien n'a été mis en évidence concernant les autres signes cliniques et la culture fongique. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 36.

*Tableau 36 - Recherche d'associations entre les signes cliniques rapportés et les éléments fongiques dans le lavage trachéal*

	Cytologie		Culture fongique	
	P-value	Test	P-Value	Test
<b>Dyspnée</b>	<b>0,0015</b>	Khi-deux	0,93	Khi-deux
<b>Toux</b>	<b>0,0028</b>	Khi-deux	0,62	Khi-deux
<b>Jetage</b>	0,41	Khi-deux	0,46	Khi-deux
<b>Contre-Performance</b>	1	Khi-deux	0,37	Fisher
<b>Intolérance à l'effort</b>	0,20	Khi-deux	0,51	Khi-deux
<b>Dilatation des naseaux</b>	<b>0,0026</b>	Khi-deux	0,62	Khi-deux
<b>Epistaxis</b>	0,59	Fisher	1	Fisher

### *Lavage broncho-alvéolaire*

Dans la population d'étude, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les éléments fongiques dans le mélange des LBA et les signes cliniques (Tableau 37).

*Tableau 37 - Recherche d'associations entre les signes cliniques rapportés et les éléments fongiques dans le mélange des LBA*

	Cytologie		Culture fongique	
	P-value	Test	P-Value	Test
<b>Dyspnée</b>	0,89	Khi-deux	0,34	Khi-deux
<b>Toux</b>	0,063	Khi-deux	0,84	Khi-deux
<b>Jetage</b>	1	Khi-deux	0,53	Khi-deux
<b>Contre-Performance</b>	0,40	Fisher	0,41	Fisher
<b>Intolérance à l'effort</b>	0,40	Khi-deux	0,36	Khi-deux
<b>Dilatation des naseaux</b>	0,34	Khi-deux	0,98	Khi-deux
<b>Epistaxis</b>	0,059	Fisher	0,32	Fisher

### C. Éléments fongiques et résultats endoscopiques, cytologiques, bactériologiques et virologiques

Les différents résultats obtenus lors de l'endoscopie et des analyses cytologiques, bactériologiques et virologiques ont été étudiés, en lien avec les éléments fongiques. Une corrélation a donc été recherchée avec la présence d'éléments fongiques dans le LT et le LBA.

#### *Lavage trachéal*

Dans le lavage trachéal, avoir un score de mucus trachéal supérieur ou égal à 3, et être diagnostiqué sEA était associé à une plus faible probabilité d'avoir des éléments fongiques en cytologie. Par ailleurs, avoir une PCR positive au virus EHV-5 était significativement associé à une cytologie positive. Concernant le reste des résultats, aucune association significative n'a pu être mise en évidence. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 38.

*Tableau 38 - Recherche d'associations entre différents résultats obtenus et les éléments fongiques dans le lavage trachéal*

	Cytologie		Culture fongique	
	P-value	Test	P-Value	P-value
Score de mucus > 2	< 0,001	Khi-deux	0,35	Khi-deux
SIT	0,53	Fisher	0,30	Fisher
Bactériologie positive	0,16	Fisher	0,60	Fisher
PCR mycoplasmes positive	0,33	Khi-deux	0,77	Khi-deux
mEA	0,81	Khi-deux	0,80	Khi-deux
sEA	< 0,001	Khi-deux	0,51	Khi-deux
EHV-2 positif	0,28	Khi-deux	0,36	Khi-deux
EHV-4 positif	1	Fisher	1	Fisher
EHV-5 positif	0,012	Khi-deux	0,31	Khi-deux
Rhinovirus B positif	0,094	Khi-deux	0,18	Khi-deux
Adénovirus 1 positif	1	Fisher	1	Fisher

### Lavage broncho-alvéolaire

Seul un cytodagnostic d'asthme équin sévère limite le risque d'avoir une cytologie positive. La présence d'une PCR EHV-5 positive est significativement associée à une culture fongique positive sur le LBA. Aucun des autres facteurs n'est associé à la cytologie comme à la culture. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 39.

Tableau 39 - Recherche d'associations entre différents résultats obtenus et les éléments fongiques dans le lavage broncho-alvéolaire

	Cytologie		Culture fongique	
	P-value	Test	P-Value	P-value
Score de mucus > 2	0,52	Khi-deux	0,081	Khi-deux
SIT	0,19	Fisher	0,20	Fisher
Bactériologie positive	0,57	Khi-deux	0,50	Khi-deux
PCR mycoplasmes positive	0,92	Khi-deux	0,87	Khi-deux
mEA	0,091	X2	0,30	X2
sEA	<b>0,046</b>	Fisher	0,87	X2
EHV-2 positif	0,36	Khi-deux	0,71	Khi-deux
EHV-4 positif	0,37	Fisher	0,051	Fisher
EHV-5 positif	0,078	Khi-deux	<b>0,003</b>	Khi-deux
Rhinovirus B positif	0,50	Khi-deux	0,42	Khi-deux
Adénovirus 1 positif	0,37	Fisher	1	Fisher

## 7. Recherche de facteurs de risque de la présence d'éléments fongiques dans les voies respiratoires

Une régression logistique a été réalisée afin de rechercher les facteurs de risque et facteurs protecteurs de la présence d'éléments fongiques dans les différents prélèvements. Celle-ci a d'abord été réalisée de façon univariée afin de déterminer les facteurs les plus susceptibles d'exercer une influence sur la détection des éléments fongiques. Une valeur de p-value < 0,15 a permis de sélectionner les facteurs les plus susceptibles d'exercer une influence, mais également de ne pas écarter trop précocement les tendances de certaines variables.

Puis une analyse multivariée a permis de hiérarchiser les facteurs les plus pertinents. Dans notre modèle, les variables à prédire ont été les suivantes :

- Une cytologie positive au LT ;
- Une culture positive au LT ;
- Une cytologie positive au LBA ;
- Une culture positive au LBA.

Les variables explicatives étaient les facteurs environnementaux, les signes cliniques et les résultats d'analyses et d'endoscopie.

### A. Cytologie positive dans le lavage trachéal

Les variables sélectionnées pour l'analyse multivariée susceptibles de prédire la cytologie positive dans le lavage trachéal étaient les suivantes :

- Litière de copeaux
- Foin trempé
- Cytodiagnostic d'asthme équin sévère (sEA)
- Score de mucus trachéal > 2
- Culture bactériologique positive
- Toux
- Dyspnée
- Dilatation des naseaux

A l'issue de cette régression, il est apparu que les chevaux ayant un score de mucus trachéal supérieur à 2 ont 3 fois moins de chances d'avoir des éléments fongiques visibles en cytologie sur le LT que les autres (**p-value = 0,012**). Ceux ayant été diagnostiqué sEA ont 4 fois moins de chances d'avoir des éléments fongiques visibles en cytologie sur le LT (**p-value = 0,035**).

### B. Culture fongique positive dans le lavage trachéal

Les variables sélectionnées pour l'analyse multivariée susceptibles de prédire la culture fongique positive dans le lavage trachéal étaient les suivantes :



- Logement en box ;
- Logement mixte ;
- Litière de copeaux ;
- Foin trempé ;
- Foin enrubanné.

A l'issue de cette régression, aucune variable n'est significativement favorisante ou protectrice d'une culture fongique positive sur le LT.

### C. Cytologie positive dans le lavage broncho-alvéolaire

Les variables sélectionnées pour l'analyse multivariée la cytologie positive dans le lavage broncho-alvéolaire étaient les suivantes :

- La présence de toux ;
- La présence d'une épistaxis ;
- Un cytodiagnostics sEA ;
- Un cytodiagnostics mEA.

A l'issue de cette régression, aucune variable n'était significativement favorisante ou protectrice d'une culture fongique positive sur le LBA.

### D. Culture fongique positive dans le lavage broncho-alvéolaire

A l'issue de l'analyse univariée, aucun des facteurs testés ne semblait significativement influencer la culture sur le LBA. L'analyse multivariée n'a donc pas été réalisée pour cette variable.

### III - Discussion

Cette étude prospective a permis de récolter des données exhaustives sur le terrain mais aussi en clinique, en totalisant 174 prélèvements, correspondant à un effectif final de 166 chevaux.

#### 1. Constitution de la population d'étude

Cette étude a permis de constituer une population de 166 chevaux sur lesquels un examen clinique et respiratoire approfondi, des prélèvements sur les différents segments de l'arbre respiratoire et des analyses cytologiques et microbiologiques ont été réalisées. Elle constitue en cela une base de données riche.

Afin de replacer cette étude dans son contexte scientifique, des publications récentes ont été analysées pour comparer les effectifs, prélèvements, et volumes utilisés pour ces derniers. Le Tableau 40 permet de synthétiser ces informations.

*Tableau 40 - Effectifs, prélèvements et volumes utilisés dans les articles déjà publiés*

<b>Auteurs</b>	<b>Année de publication</b>	<b>Effectif de la population</b>	<b>Types de prélèvements réalisés</b>	<b>Volumes utilisées</b>
<b>Dauvillier et al.</b>	2019	731	LT LBA	20 mL (LT) 180 mL (LBA)
<b>Hermange et al.</b>	2018	51	LBA	250 + 250 mL
<b>Rossi et al.</b>	2018	154	LT LBA	10-20 mL (LT) 240-360 mL(LBA)
<b>Dobesova and Bezdekova</b>	2016	19	LPG	25 mL
<b>Orard et al.</b>	2015	30	LBA	250 + 500 mL
<b>Depecker et al.</b>	2013	138	LBA	250 + 250 mL
<b>Koblinger et al.</b>	2011	128	LBA	250 mL
<b>Bedenice et al.</b>	2008	137	LBA	500 mL
<b>Wood et al</b>	2005	148	LT	30 mL
<b>Chiesa et al.</b>	2002	10	LPG	20 mL

Ainsi, l'effectif de 166 chevaux de notre étude est inférieur à certaines études (Dauvillier et al. 2019), mais est comparable ou supérieur à la majorité des autres (Hermange et al. 2019; Rossi et al. 2018;

Orard et al. 2016; Depecker et al. 2014; Koblinger et al. 2011; Bedenice, Mazan, Hoffman 2008; Wood et al. 2005). Par ailleurs, à notre connaissance, aucune étude ne recense autant de prélèvements respiratoires sur une telle cohorte. Enfin, le caractère prospectif de cette étude est pertinent et a permis d'inclure une grande diversité de races et de profils de chevaux différents.

## 2. Mise en perspective des méthodes utilisées

### A. Méthodes de prélèvement

#### *Lavage des poches gutturales*

Le lavage des poches gutturales a été réalisé par voie endoscopique, en instillant 40 mL de sérum physiologique tiédi dans chaque poche. Ce prélèvement est couramment employé afin de diagnostiquer les infections par *Streptococcus equi equi*, agent responsable de la gourme (Boyle et al. 2018). Toutefois, l'analyse cytologique de ce prélèvement est rare : une seule étude recensant 38 prélèvements sur 19 chevaux (Dobesova, Bezdekova 2016) décrit les cytologies obtenues sur des lavages des poches gutturales par voie transendoscopique. D'autres publications plus anciennes ont décrit des cytologies à partir de lavages transcutanés (Chiesa et al. 2002; Chiesa, Vidal, et al. 1999; Chiesa, García, et al. 1999). Dans ces publications, les lavages étaient réalisés avec 20 à 25 mL de sérum physiologique contre 40 mL dans notre étude. Les cellules majoritairement rencontrées étaient les cellules épithéliales, et le lavage était considéré comme normal lorsqu'il y avait moins de 5% de neutrophiles et pathologique au-delà de 25%.

Dans cette étude le volume utilisé est de 40 mL et le seuil de cytodiagnostics d'inflammation était fixé à 20% de PN, par analogie avec le lavage trachéal.

#### *Lavage trachéal*

Dans cette étude, le lavage trachéal était réalisé en instillant 40 mL de sérum physiologique tiédi par un cathéter transendoscopique stérile à double lumière. Cette méthode est peu invasive, et permet d'obtenir un prélèvement stérile. Les lavages trachéaux sont parfois réalisés par voie trans-trachéale : ce qui nécessite une tonte et désinfection de la peau, une anesthésie locale, une incision cutanée et enfin la ponction de la trachée. Elle est donc plus invasive et le délai d'attente des anesthésiques locaux avant une compétition étant significatif, cela aurait limité son usage dans notre population de chevaux de courses.

Les volumes utilisés dans la littérature sont généralement compris entre 10 et 30 mL (Dauvillier et al. 2019; Rossi et al. 2018; Wood et al. 2005), contre 40 mL dans cette étude.

## Recherche d'éléments fongiques

La recherche des éléments fongiques dans le LT a été faite par cytologie et par culture fongique. Ces deux méthodes sont également employées dans l'article de Dauvillier et al. (2019). Les résultats seront détaillés plus tard.

### *Lavages broncho-alvéolaires*

Le lavage broncho-alvéolaire peut être réalisé de deux façons : ou bien à l'aveugle à l'aide d'une sonde longue ou bien avec un endoscope « digestif » de grande longueur. Lors de LBA à l'aveugle, la conformation pulmonaire du cheval explique que le poumon caudo-dorsal droit sera le plus souvent prélevé (Sweeney et al. 1992). Pour cette raison, dans cette étude, les LBA ont été réalisés sous endoscopie, afin de pouvoir réaliser deux lavages, dans les poumons gauche et droit, et de constituer un mélange des deux pour certaines analyses.

Quelle que soit la méthode employée, la réalisation du LBA n'est pas stérile. Toutefois, les résultats de mycologie obtenus (22,8% contre 82,5% dans la trachée) et le faible accord obtenu entre les deux sites de prélèvement permettent d'exclure une contamination majeure liée au passage des naseaux, du pharynx et de la trachée.

La solution utilisée pour les LBA est le Chlorure de sodium à 0,9%, celle-ci est également employée dans les autres études précédemment citées. Malgré son pH acide (pH = 5,5), elle est appropriée et ne génère pas plus d'inflammation 48h après un LBA que d'autres solutions plus neutres, comme le Ringer Lactate® par exemple (Westermann et al. 2023).

Le volume employé par poumon varie entre 180 et 500 mL dans les différentes études présentées plus haut. Le volume de 500 mL par poumon utilisé dans cette étude est recommandé dans plusieurs études, dont l'article de consensus (Couëtil et al. 2016; Hoffman 2008) pour la cytologie. Par ailleurs, l'importance d'utiliser le même volume pour tous les chevaux a été démontré : le volume employé influence le profil cytologique du cheval (Orard et al. 2016).

L'utilisation ou non de sédation pour la réalisation des LBA, en particulier de butorphanol, a été précédemment étudiée (Westermann et al. 2005), et le butorphanol n'affecte pas les volumes récupérés ainsi que les proportions de neutrophiles dans les prélèvements. Pour cette raison, nous pouvons interpréter les résultats sans tenir compte du protocole de sédation employé.

## B. Méthodes d'analyse

### *Cytologie*

La préparation des prélèvements en vue de l'analyse est très similaire à ce qui est couramment décrit. L'utilisation de tubes EDTA de 5 à 10 mL est fréquemment décrite et ce afin de limiter l'agrégation cellulaire. Par ailleurs, l'usage d'une centrifugeuse ou cytocentrifugeuse est le plus fréquent, associé parfois à un frottis ou étalement direct. La coloration varie selon les articles, les plus fréquemment employées sont le May-Grünwald-Giemsa, le bleu de Toluidine et la coloration

Diff-Quick®. Il existe de légères différences dans la détection des mastocytes, notamment entre le bleu de Toluidine et la coloration Diff-Quick®. Cela pourrait expliquer les variations de résultats entre les différentes études (Hoffman 2008).

Dans cette étude, le comptage effectué est de 300 cellules. Il varie entre 200 et 400 dans les articles précédemment cités (Dauvillier, Ter Woort, van Erck-Westergren 2019; Rossi et al. 2018; Bedenice, Mazan, Hoffman 2008) et il est souvent considéré que 400 cellules constitue une référence (Hoffman 2008). Toutefois nous ignorons si ces différences sont sources de variations diagnostiques.

### *Culture fongique*

Il n'existe pas de méthode standardisée lors de culture fongique, et peu d'informations sont disponibles sur le sujet en médecine vétérinaire. En médecine humaine, il est décrit que les milieux de culture utilisés en routine conduisent à une sous-estimation de la prévalence des moisissures et levures dans les voies respiratoires des patients asthmatiques ou atteints de mucoviscidose (Pashley et al. 2012; Pashley 2014). Toutefois, ces analyses étaient réalisées à partir du mucus des patients, et pas à partir de LT ou LBA.

Le conditionnement et le transport des prélèvements sont par ailleurs sujets à des variations. Dans cette étude, ils étaient transportés sous couvert de froid dans un tube stérile alors que dans l'étude Dauvillier et al., ils étaient placés directement dans un tube contenant un milieu de type Sabouraud et transportés à température ambiante.

Les milieux de culture spécifiques les plus fréquemment utilisés associent une gélose de type Sabouraud (à base d'agar et de dextrose) et des antibiotiques afin de limiter la croissance bactérienne. Dans notre étude, des géloses de Sabouraud et de gentamicine ou d'acididione ont été utilisées pour l'identification des éléments fongiques. Malgré l'absence de standardisation, les deux genres principalement identifiés dans les prélèvements sont les mêmes entre cette étude et celle de Dauvillier et al., à savoir *Aspergillus* et *Penicillium*, ce qui témoigne d'un certain accord entre ces études.

### 3. Recherche des éléments fongiques et prévalence

Les prévalences de détection des éléments fongiques sont comparées à l'article de Dauvillier et al. (2019) dans le tableau 41.

Tableau 41 - Comparaison des prévalences de détection des éléments fongiques obtenus dans différentes études

		Notre étude	Dauvillier et al.
LT	Cytologie	76,6%	79%
	Culture	82,5%	55%
LBA	Cytologie	20,5%	37,3%
	Culture	22,8%	Non réalisé.

La prévalence de détection des éléments fongiques est très élevée, autour de 80% des individus, aussi bien en cytologie qu'en culture, et elle atteint 94% toutes méthodes confondues. En revanche, dans le LBA, la prévalence chute nettement, légèrement au-dessus de 20% pour chaque méthode.

Une hypothèse expliquant les différents résultats de culture peut être les différentes conditions de transport et de conditionnement entre les études. Un transport à température ambiante est susceptible d'altérer le prélèvement avant la culture, et donc de diminuer le nombre de prélèvements positifs.

Des éléments fongiques phagocytés ont été visualisés en cytologie respectivement dans 88,6% et 67,2% des prélèvements positifs dans le LBA et le LT. Il a été décrit que des signes de phagocytose sont plus susceptibles d'indiquer une infection réelle (Bain 1997).

Ces données, ainsi que la forte prévalence de prélèvements trachéaux positifs, y compris chez des individus cliniquement sains, suggère que les éléments fongiques détectés dans la trachée, résultent plus fréquemment d'une contamination des voies aériennes que d'une infection réelle par rapport au LBA. Il serait désormais pertinent d'étudier le lien éventuel entre la présence des éléments fongiques et l'asthme équin.

#### 4. Comparaison des méthodes et sites de détection

La comparaison des méthodes de détection par le calcul du coefficient Kappa de Cohen a montré qu'il n'existait qu'un faible accord entre la cytologie et la culture pour la détection des éléments fongiques. Ainsi, ces deux méthodes semblent peu corrélées, bien que leurs prévalences ne soient pas significativement différentes. Cela est valable pour les prélèvements de LT comme de LBA. Ces données sont en accord avec celles précédemment publiées (Dauvillier et al. 2019) où un coefficient de Kappa de 0,063 avait été obtenu.

Il est donc délicat de préconiser l'une des deux méthodes dans l'objectif de poser un diagnostic individuel. Des travaux sont encore nécessaires afin de tester si l'une de ces méthodes est mieux corrélée à certaines affections ou non.

La comparaison des sites de prélèvement n'a montré qu'un faible accord également entre le LT et le LBA, que ce soit pour la cytologie ou la culture. Ce résultat est cohérent étant donnée la grande différence de prévalence dans les deux sites de prélèvement.

La comparaison des différents prélèvements de LBA a montré qu'il existait un accord satisfaisant entre le prélèvement de LBA<sub>m</sub> et les prélèvements droit et gauche. Le mélange des LBA est donc représentatif des deux LBA dans le cadre de la détection des éléments fongiques par cytologie. Ce résultat montre l'intérêt de réaliser deux LBA et des analyses sur le mélange des deux, d'autant plus que l'accord entre les LBA<sub>g</sub> et LBA<sub>d</sub> n'était que moyen. Ces résultats permettent de confirmer l'intérêt précédemment décrit de réaliser un mélange des deux LBA dans le cadre de la cytologie. En effet, le prélèvement de l'un des deux poumons peut être à l'origine d'erreurs de diagnostic, alors que le mélange est représentatif de chacun des deux poumons (Depecker et al. 2014; Hermange et al. 2019).

## 5. Mise en perspective des corrélations obtenues concernant la détection des éléments fongiques

L'existence d'une association entre l'alimentation avec du foin trempé et les deux prélèvements trachéaux et celle entre une litière de copeaux et la culture fongique du LT est cohérente. Le trempage du foin est susceptible de réduire les aérosols générés par celui-ci, et donc probablement de limiter l'inhalation de particules fongiques. Il a en effet été prouvé que le trempage du foin avant l'alimentation réduisait la concentration en poussières respirables. Les poussières dites respirables sont des particules de taille inférieure à 5 micromètres et sont capables d'aller jusqu'au niveau alvéolaire. De même, l'utilisation d'une litière en copeaux réduit les poussières présentes dans l'environnement, en comparaison avec la paille (Clements, Pirie 2007; Ivester, Couëtil, Zimmerman 2014; Pirie et al. 2003; Siegers et al. 2018).

Un score de mucus trachéal supérieur à 3 à l'endoscopie, un cytodiagnostics d'asthme équin sévère et certains signes cliniques rapportés par les propriétaires (c'est le cas de la toux, de la dyspnée et de la dilatation des naseaux) sont associés à une cytologie du LT négative. Ces signes peuvent être des symptômes d'asthme équin sévère. Ces chevaux avaient pour la plupart déjà été diagnostiqués comme étant asthmatiques et les propriétaires avaient mis en place certaines mesures environnementales afin de réduire leur exposition aux poussières, comme le trempage ou la stérilisation du foin mais aussi un hébergement en paddock ou une litière en copeaux. Cette association montre donc que les mesures mises en place réduisent effectivement les éléments fongiques visibles en cytologie. C'est également pour cette raison que le cytodiagnostics d'asthme équin sévère était associé à des cytologies du LT et du LBA négatives. Cela témoigne donc qu'il est possible de limiter la colonisation des voies aériennes profondes par des éléments fongiques en adoptant des mesures environnementales.

Un résultat positif lors de la PCR à EHV-5 sur le lavage trachéal était associé à une cytologie trachéale positive et une culture positive dans le LBA. Beaucoup de chevaux porteurs du virus EHV-5 appartenaient au groupe des trotteurs à l'entraînement, chez qui une prévalence élevée de

moisissures dans le LT a été mise en évidence. Ainsi il est possible que ce résultat ne soit pas révélateur d'un lien réel entre l'EHV-5 et les moisissures dans la trachée.

Lors de la régression logistique, aucun facteur de risque n'a pu être mis en évidence pour la culture fongique, ni pour la cytologie du LBA. Les seuls facteurs ayant un impact sur la cytologie du LT sont un excès de mucus trachéal et le cytodiagnostics sEA. Ces éléments sont communs aux chevaux asthmatiques sévères de notre étude et sont plus révélateurs d'un biais de population que d'un lien réel entre l'asthme sévère et l'absence d'éléments fongiques. Toutefois, ces résultats semblent conforter le lien qui existe entre la gestion environnementale des équidés, comme le logement, l'alimentation et la litière, et la contamination de la trachée par des éléments fongiques.

## 6. Éléments fongiques dans le foin et les voies respiratoires

La méthode de culture fongique à partir du foin employée ici est comparable à celle utilisée dans les études publiées (Andersen et al. 2020). Une autre méthode consiste à mettre en culture les aérosols directement obtenus à partir du foin (Seguin et al. 2010). Dans cette étude, réalisée sur des pâtures normandes, les genres et espèces les plus fréquemment isolés sont les mêmes que ceux isolés dans notre étude. Ces deux méthodes semblent donc conduire à des résultats similaires.

Les prélèvements de foin ont mis en évidence une très grande variation dans la quantité de levures et moisissures obtenues par culture et la diversité d'espèces fongiques présentes. La moyenne était de 316 000 colonies par gramme, avec un écart-type de 758 000 colonies par gramme. La qualité mycologique du foin est donc très variable. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, les essences végétales présentes dans la pâture, le rang de fauche, mais aussi les conditions de conservation affectent la quantité de moisissures présentes dans le foin (Seguin et al. 2010; Séguin et al. 2012).

À notre connaissance aucune étude n'a précédemment comparé les moisissures cultivées à partir du foin et des prélèvements respiratoires. Dans notre étude, seuls un peu plus d'un tiers (37%) des chevaux avaient des moisissures dans la trachée communes avec celles du foin. Ce faible pourcentage nous conduit à penser que les sources de contamination des voies respiratoires par des éléments fongiques sont multiples. La paille pourrait notamment être une autre source de contamination.

## 7. Limites de l'étude

Parmi les limites de notre étude, plusieurs éléments sont à soulever. Tout d'abord, les prélèvements ont été réalisés tout au long de l'année, à différentes saisons. La quantité d'éléments fongiques dans l'air est affectée par la température, l'humidité, le vent, et les précipitations (Priyamvada et al. 2017). Des variations saisonnières ont également été décrites dans des écuries (Nardoni et al. 2005). Ces éléments, en modifiant la concentration de particules fongiques, peuvent influencer sur leur détection dans les voies respiratoires.



Dans cette population, les chevaux asthmatiques sévères avaient pour la plupart déjà été diagnostiqués comme tel. L'inclusion dans l'étude de chevaux asthmatiques sévères non encore diagnostiqués aurait été pertinente car cela aurait permis de voir si l'asthme en tant que tel modifie la détection des éléments fongiques dans les voies respiratoires.

L'analyse des prélèvements de foin en comparaison avec les voies respiratoires a montré que de nombreuses moisissures détectées dans les voies respiratoires n'étaient pas présentes dans le foin. Cela suggère qu'il existe d'autres sources de contamination que le foin. Ainsi, il aurait été pertinent de rechercher d'autres sources de moisissures dans l'environnement des chevaux, comme dans la paille par exemple.

Dans cette étude, nous avons considéré tous les genres et espèces obtenus en culture fongique sur le même plan, sans distinction. Or, nous savons que certaines espèces ont un pouvoir pathogène bien supérieur à d'autres, qui peuvent être des pathogènes opportunistes, ou même commensales. Le genre *Aspergillus* par exemple, fréquemment détecté dans notre étude, est un pathogène opportuniste. Cela a été étudié en médecine humaine comme en médecine vétérinaire (Denning et al. 2014; Stewart, Cuming 2015). Par ailleurs, nous savons que le pouvoir sensibilisant et allergénique des éléments fongiques est également très variable selon les espèces et celui-ci est différent du pouvoir pathogène (Denning et al. 2014). Malheureusement, peu de données sont disponibles sur ce sujet en médecine équine. Pourtant, dans l'exploration de l'asthme équin, la connaissance des espèces les plus sensibilisantes pourrait conduire à une optimisation dans la gestion des écuries, afin de limiter l'exposition. L'étude des différentes Immunoglobulines E spécifiques aux espèces fongiques est une piste intéressante dans cet objectif (Niedzwiedz, Jaworski, Kubiak 2015; Wyler et al. 2023).

## Conclusion

A l'issue de cette étude, il apparait que des éléments fongiques sont fréquemment détectés dans les voies respiratoires des chevaux. Ils sont présents chez environ 80% des lavages trachéaux, aussi bien en culture fongique qu'en cytologie. Dans les lavages broncho-alvéolaires, leur prévalence dépasse les 20%, que ce soit par cytologie ou culture fongique.

La forte prévalence de ces éléments dans la trachée, 94% des chevaux toutes méthodes confondues, et le lien qui existe entre le logement, la litière employée ou le foin est plus en faveur d'une contamination par des poussières respirables que d'un état pathologique.

En revanche, la présence de ces éléments dans le lavage broncho-alvéolaires ne semble pas liée à la gestion environnementale des équidés. Par ailleurs, la prévalence plus faible de ces éléments dans les poumons et les signes de phagocytose presque systématiquement visibles en cytologie, supposent donc plus une atteinte pathologique. Le LBA, et particulièrement le mélange des LBA des deux poumons semble être un prélèvement plus approprié pour détecter les éléments fongiques.

Toutefois, dans cette étude, comme cela a été décrit précédemment, la cytologie et la culture fongique sont peu corrélées, et ce, quel que soit le site de prélèvement. Il serait désormais pertinent de préciser la relation entre les éléments fongiques et l'asthme équin, afin de déterminer notamment s'il existe une méthode de choix pour détecter ces éléments.

## Bibliographie

ANDERSEN, Birgitte, PHIPPEN, Christopher, FRISVAD, Jens C., EMERY, Sue et EUSTACE, Robert A., 2020. Fungal and chemical diversity in hay and wrapped haylage for equine feed. *Mycotoxin Research*. mai 2020. Vol. 36, n° 2, pp. 159-172. DOI 10.1007/s12550-019-00377-5.

AUER, D. E., WILSON, R. G. et GROENENDYK, S., 1985. Pharyngeal lymphoid hyperplasia in Thoroughbred racehorses in training. *Australian Veterinary Journal*. 1985. Vol. 62, n° 4, pp. 124-126. DOI 10.1111/j.1751-0813.1985.tb07259.x.

BAIN, Fairfield, 1997. Cytology of the Respiratory Tract. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. décembre 1997. Vol. 13, n° 3, pp. 477-486. DOI [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30225-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30225-0).

BEDENICE, D., MAZAN, M.R. et HOFFMAN, A.M., 2008. Association between Cough and Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Pulmonary Function in Horses Diagnosed with Inflammatory Airway Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. juillet 2008. Vol. 22, n° 4, pp. 1022-1028. DOI 10.1111/j.1939-1676.2008.0109.x.

BOYLE, A.G., TIMONEY, J.F., NEWTON, J.R., HINES, M.T., WALLER, A.S. et BUCHANAN, B.R., 2018. Streptococcus equi Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles—Revised Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2018. Vol. 32, n° 2, pp. 633-647. DOI 10.1111/jvim.15043.

CHIESA, O. A., GARCÍA, F., DOMINGO, M. et CUENCA, R., 1999. Cytological and microbiological results from equine guttural pouch lavages obtained percutaneously: correlation with histopathological findings. *Veterinary Record*. mai 1999. Vol. 144, n° 22, pp. 618-621. DOI 10.1136/vr.144.22.618.

CHIESA, O. A., VIDAL, D., DOMINGO, M. et CUENCA, R., 1999. Cytological and bacteriological findings in guttural pouch lavages of clinically normal horses. *Veterinary Record*. mars 1999. Vol. 144, n° 13, pp. 346-349. DOI 10.1136/vr.144.13.346.

CHIESA, Oa, CUENCA, R, MAYAYO, E, GUARRO, J, SANTAMARIA, J et STCHIGEL, Am, 2002. Cytological and microbiological findings in guttural pouch lavages of clinically normal horses with head restraint. *Australian Veterinary Journal*. avril 2002. Vol. 80, n° 4, pp. 234-238. DOI 10.1111/j.1751-0813.2002.tb10822.x.

CLEMENTS, J.M. et PIRIE, R.S., 2007. Respirable dust concentrations in equine stables. Part 2: The benefits of soaking hay and optimising the environment in a neighbouring stable. *Research in Veterinary Science*. octobre 2007. Vol. 83, n° 2, pp. 263-268. DOI 10.1016/j.rvsc.2006.12.003.

COUËTIL, L.I., CARDWELL, J.m., GERBER, V., LAVOIE, J.-P., LÉGUILLETTE, R. et RICHARD, E.a., 2016. Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2016. Vol. 30, n° 2, pp. 503-515. DOI 10.1111/jvim.13824.

DAUVILLIER, Julie, TER WOORT, Fe et VAN ERCK-WESTERGREN, Emmanuelle, 2019. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. mars 2019. Vol. 33, n° 2, pp. 968-975. DOI 10.1111/jvim.15397.

DENNING, David W, PASHLEY, Catherine, HARTL, Domink, WARDLAW, Andrew, GODET, Cendrine, DEL GIACCO, Stefano, DELHAES, Laurence et SERGEJEVA, Svetlana, 2014. Fungal allergy in asthma—state of the art and research needs. *Clinical and Translational Allergy*. janvier 2014. Vol. 4, n° 1, pp. 14. DOI 10.1186/2045-7022-4-14.

DEPECKER, Marianne, RICHARD, Eric A., PITEL, Pierre-Hugues, FORTIER, Guillaume, LELEU, Claire et COUROUCÉ-MALBLANC, Anne, 2014. Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: Influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. *The Veterinary Journal*. janvier 2014. Vol. 199, n° 1, pp. 150-156. DOI 10.1016/j.tvjl.2013.10.013.

DOBESOVA, Olga et BEZDEKOVA, Barbora, 2016. Cytological and bacteriological evaluation of transendoscopic guttural pouch lavages in clinically healthy horses. *Acta Veterinaria Hungarica*. juin 2016. Vol. 64, n° 2, pp. 179-188. DOI 10.1556/004.2016.018.

GERBER, V., STRAUB, R., MARTI, E., HAUPTMAN, J., HERHOLZ, C., KING, M., IMHOF, A., TAHON, L. et ROBINSON, N. E., 2004. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal*. 2004. Vol. 36, n° 7, pp. 576-582. DOI 10.2746/0425164044864525.

HERMANGE, T., LE CORRE, S., BIZON, C., RICHARD, E.A. et COUROUCÉ, A., 2019. Bronchoalveolar lavage fluid from both lungs in horses: Diagnostic reliability of cytology from pooled samples. *The Veterinary Journal*. février 2019. Vol. 244, pp. 28-33. DOI 10.1016/j.tvjl.2018.12.002.

HOFFMAN, Andrew M., 2008. Bronchoalveolar Lavage: Sampling Technique and Guidelines for Cytologic Preparation and Interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. août 2008. Vol. 24, n° 2, pp. 423-435. DOI 10.1016/j.cveq.2008.04.003.

IVESTER, K.M., COUËTIL, L.L. et ZIMMERMAN, N.J., 2014. Investigating the Link between Particulate Exposure and Airway Inflammation in the Horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. novembre 2014. Vol. 28, n° 6, pp. 1653-1665. DOI 10.1111/jvim.12458.

KOBLINGER, K., NICOL, J., MCDONALD, K., WASKO, A., LOGIE, N., WEISS, M. et LÉGUILLETTE, R., 2011. Endoscopic Assessment of Airway Inflammation in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. septembre 2011. Vol. 25, n° 5, pp. 1118-1126. DOI 10.1111/j.1939-1676.2011.00788.x.

NARDONI, Simona, MANCIANTI, Francesca, SGORBINI, Micaela, TACCINI, Fabrizio et CORAZZA, Michele, 2005. Identification and seasonal distribution of airborne fungi in three horse stables in Italy. *Mycopathologia*. août 2005. Vol. 160, n° 1, pp. 29-34. DOI 10.1007/s11046-005-2669-3.

NIEDZWIEDZ, Artur, JAWORSKI, Zbigniew et KUBIAK, Krzysztof, 2015. Serum concentrations of allergen-specific IgE in horses with equine recurrent airway obstruction and healthy controls assessed by ELISA. *Veterinary Clinical Pathology*. septembre 2015. Vol. 44, n° 3, pp. 391-396.

DOI 10.1111/vcp.12274.

ORARD, Marie, DEPECKER, Marianne, HUE, Erika, PITEL, Pierre-Hugues, COUROUCÉ-MALBLANC, Anne et RICHARD, Eric A., 2016. Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *The Veterinary Journal*. janvier 2016. Vol. 207, pp. 193-195. DOI 10.1016/j.tvjl.2015.09.027.

PASHLEY, Catherine H., 2014. Fungal Culture and Sensitisation in Asthma, Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disorder: What Does It Tell Us? *Mycopathologia*. décembre 2014. Vol. 178, n° 5-6, pp. 457-463. DOI 10.1007/s11046-014-9804-y.

PASHLEY, Catherine H., FAIRS, Abbie, MORLEY, Joseph P., TAILOR, Shreeya, AGBETILE, Joshua, BAFADHEL, Mona, BRIGHTLING, Christopher E. et WARDLAW, Andrew J., 2012. Routine processing procedures for isolating filamentous fungi from respiratory sputum samples may underestimate fungal prevalence. *Medical Mycology*. mai 2012. Vol. 50, n° 4, pp. 433-438. DOI 10.3109/13693786.2011.615762.

PIRIE, R. S., COLLIE, D. D. S., DIXON, P. M. et MCGORUM, B. C., 2003. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma): Dust particulates in equine heaves. *Clinical & Experimental Allergy*. mai 2003. Vol. 33, n° 5, pp. 676-683. DOI 10.1046/j.1365-2222.2003.01640.x.

PRIYAMVADA, Hema, SINGH, Raj Kamal, AKILA, M., RAVIKRISHNA, R., VERMA, Rama Shanker et GUNTHER, Sachin S., 2017. Seasonal variation of the dominant allergenic fungal aerosols – One year study from southern Indian region. *Scientific Reports*. 11 septembre 2017. Vol. 7, pp. 11171. DOI 10.1038/s41598-017-11727-7.

RAKER, C.W. et BOLES, C.L., 1978. Paryngeal lymphoid hyperplasia in the horse. *J. Equine Med. Surg.* 1978. Vol. 2, pp. 202-207. DOI 006098599.

ROSSI, Heini, VIRTALA, Anna-Maija, RAEKALLIO, Marja, RAHKONEN, Emmi, RAJAMÄKI, Minna M. et MYKKÄNEN, Anna, 2018. Comparison of Tracheal Wash and Bronchoalveolar Lavage Cytology in 154 Horses With and Without Respiratory Signs in a Referral Hospital Over 2009–2015. *Frontiers in Veterinary Science*. 26 mars 2018. Vol. 5, pp. 61. DOI 10.3389/fvets.2018.00061.

SEGUIN, V., LEMAUVIEL-LAVENANT, S., GARON, D., BOUCHART, V., GALLARD, Y., BLANCHET, B., DIQUELOU, S., PERSONENI, E., GAUDUCHON, P. et OURRY, A., 2010. An evaluation of the hygienic quality in single-species hays and commercial forages used in equine nutrition: Hygienic quality of equine forages. *Grass and Forage Science*. 7 juillet 2010. pp. no-no. DOI 10.1111/j.1365-2494.2010.00751.x.

SÉGUIN, Virginie, GARON, David, LEMAUVIEL-LAVENANT, Servane, LANIER, Caroline, BOUCHART, Valérie, GALLARD, Yves, BLANCHET, Benoît, DIQUÉLOU, Sylvain, PERSONENI, Emmanuelle et OURRY, Alain, 2012. How to improve the hygienic quality of forages for horse feeding: Improving the quality of forages for horses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 15 mars 2012. Vol. 92, n° 4, pp. 975-986. DOI 10.1002/jsfa.4680.

SIEGERS, Esther Willemijn, ANTHONISSE, Milou, VAN EERDENBURG, Frank J. C. M., VAN DEN

BROEK, Jan, WOUTERS, Inge M. et WESTERMANN, Cornélie Martine, 2018. Effect of ionization, bedding, and feeding on air quality in a horse stable. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. mai 2018. Vol. 32, n° 3, pp. 1234-1240. DOI 10.1111/jvim.15069.

STEWART, Allison J. et CUMING, Rosemary S., 2015. Update on fungal respiratory disease in horses. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. avril 2015. Vol. 31, n° 1, pp. 43-62. DOI 10.1016/j.cveq.2014.11.005.

SWEENEY, C. R., ROSSIER, Y., ZIEMER, E. L. et LINDBORG, S., 1992. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *American Journal of Veterinary Research*. août 1992. Vol. 53, n° 8, pp. 1376-1379.

WESTERMANN, Cornélie M., DE BIE, Annelieke G., OLAVE, Carla, DE GRAUW, Janny C., TESKE, Erik et COUETIL, Laurent L., 2023. Effect of Lavage Solution Type on Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology in Clinically Healthy Horses. *Animals*. 15 août 2023. Vol. 13, n° 16, pp. 2637. DOI 10.3390/ani13162637.

WESTERMANN, Cornélie M., LAAN, Tamarinde T., VAN NIEUWSTADT, Roel A., BULL, Sarah et FINK-GREMMELS, Johanna, 2005. Effects of antitussive agents administered before bronchoalveolar lavage in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 1 août 2005. Vol. 66, n° 8, pp. 1420-1424. DOI 10.2460/ajvr.2005.66.1420.

WOOD, J. L. N., NEWTON, J. R., CHANTER, N. et MUMFORD, J. A., 2005. Association between Respiratory Disease and Bacterial and Viral Infections in British Racehorses. *Journal of Clinical Microbiology*. janvier 2005. Vol. 43, n° 1, pp. 120-126. DOI 10.1128/JCM.43.1.120-126.2005.

WYLER, Michelle, SAGE, Sophie Elena, MARTI, Eliane, WHITE, Samuel et GERBER, Vinzenz, 2023. Protein microarray allergen profiling in bronchoalveolar lavage fluid and serum of horses with asthma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. janvier 2023. Vol. 37, n° 1, pp. 328-337. DOI 10.1111/jvim.16600.

# Annexe

## Annexe 1 : Feuille de commémoratifs et d'anamnèse – demande d'analyse :



Reçu le : \_\_\_\_\_ à \_\_\_\_\_ T° : \_\_\_\_\_  
Par \_\_\_\_\_ Agent : \_\_\_\_\_  
Prélèvement

Dossier n° : \_\_\_\_\_



Pôle Recherche

### DEMANDE D'ANALYSES - ÉTUDE MOLDEA - PHASE EPIDEMIOLOGIE

Dr Vétérinaire : MME Anne COUROUCÉ

Propriétaire : \_\_\_\_\_

Adresse : ONIRIS-ENV, la Chanterie, 44307 Nantes cedex 3

Adresse : \_\_\_\_\_

Email : anne.courouce@oniris-nantes.fr

Prélèvement effectué le : \_\_\_\_\_

Nom du cheval : \_\_\_\_\_

Race : \_\_\_\_\_ Sexe : \_\_\_\_\_ Date de naissance : \_\_\_\_\_ Numéro SIRE : \_\_\_\_\_

### ÉCHANTILLONS

#### Volumes des lavages

✓ Poches gutturales : Gauche : *Volume récupéré* : \_\_\_\_\_ ml Droite : *Volume récupéré* : \_\_\_\_\_ ml

✓ lavage trachéal : *Volume récupéré* : \_\_\_\_\_ ml

✓ Lavages bronchoalvéolaires :  
Gauche : *Volume récupéré* : \_\_\_\_\_ ml Droite : *Volume récupéré* : \_\_\_\_\_ ml

### ANALYSES

✓ NF - Autres analyses :

✓ Cytologie : coloration MGG

Mélanges Poches gutturales,  LT,  LBA droit,  LAB gauche,  LBA Mélanges

✓ Bactériologie :

LT, forfait respiratoire.

✓ Mycologie :

Mélanges des 2 Poches gutturales,  LBA, Mélanges des 2 poumons

LT - identification quel que soit le nombre de colonies, Quantification en masse.

✓ Biologie Moléculaire :

Mélanges Poches gutturales, PCR *Strepto. equi*.

Lavage trachéal, Forfait respiratoire équin (8 valences). EHV-1, EHV-2, EHV-4, EHV-5, Grippe, Rhinovirus A, Rhinovirus B, Adenovirus 1.

✓ **Analyses à facturer au propriétaire**

## COMMÉMORATIFS

### Environnement et alimentation:

- Hébergement :**  Box,  Pré,  Paddock ( herbe -  sable -  autre \_\_\_\_\_),  Mixte
- Litière :**  Paille,  Copeaux,  Autre \_\_\_\_\_
- Fourrage :**  Foin sec,  Foin trempé,  Foin stérilisé,  Enrubanné,  présentation en filet,  présentation à terre
- Suppléments :**  Céréales,  Concentrés (granulés, mash,...),  compléments : \_\_\_\_\_

### Entraînement :

- Repos**, depuis le \_\_\_\_\_  **Entraînement**, depuis le \_\_\_\_\_
- Compétition**, type : \_\_\_\_\_ Nombre de départs : \_\_\_\_\_ Classement : \_\_\_\_\_

### Signes cliniques

- Dyspnée** :  Oui  Non  **Toux** :  non,  rare,  fréquente,  début d'exercice
- Jetage** :  non,  sévère,  muqueux,  purulent  **Dilatation des naseaux**  Oui  Non
- Contre-performance**;  **Intolérance à l'effort**;  **Épistaxis**;  Autres \_\_\_\_\_

### Examen clinique & endoscopie

**Etat corporel** : \_\_\_/5 **T° rectale (°C)** : \_\_\_\_\_ **FC (bat/min)** : \_\_\_\_\_ **FR (mvts/min)** : \_\_\_\_\_

**Pharyngite** : \_\_\_/4 **Larynx** : \_\_\_\_\_ **Poches gutturales** :

**Aspect des muqueuses** :  normales,  congestionnées,  pâles,  cyanosées,  jaunes-orange, TRC :

**Ganglions sous-mandibulaires** :  non palpables,  palpables,  hypertrophiés,  douloureux.

#### Courbe respiratoire :

- Dyspnée expiratoire (ligne de pousse)  Dyspnée inspiratoire (tirage costal).  Autre :

**Auscultation au sac** :  Oui  Non

Tolérance :  Bonne,  Mauvaise. Temps de récupération :  Normal,  Augmenté.

Crépitements : *intensité*:  léger,  modéré,  marqué

Sifflements :  léger,  modéré,  marqué

Toux déclenchée :  sac  endoscopie

Sang trachéal \_\_\_/4  Mucus trachéal \_\_\_/5  Autres \_\_\_\_\_

Pôle d'analyses et de recherche de Normandie

LABÉO Frank Duncombe - 1, route de Rosel - Saint-Contest - 14 053 CAEN Cedex 4 - Pôle Santé : 02 31 47 19 19 - lfd-sante@laboratoire-labeo.fr  
Laboratoire agréé par les ministères de l'Agriculture, de la Santé\*, de l'Environnement\* et de l'Économie\*. \*Portée de l'agrément, voir site internet de ces ministères.  
Accréditations COFRAC N° 1-56B4 et N° 2-56B7. Portée disponible sur www.cofrac.fr

DESA003 - V06 - 01/01/2020







**Charles DESSON**

**VARIABILITÉ DE DÉTECTION DES MOISSURES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES DU CHEVAL : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR UNE POPULATION DE 166 CHEVAUX**

VARIABILITY OF FUNGAL DETECTION IN THE AIRWAYS OF HORSES : EXPERIMENTAL STUDY ON 166 HORSES

**Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire** : Nantes, le 24 Octobre 2023

**RESUME**

La présence d'éléments fongiques (spores ou hyphes) a souvent été rapportée dans les voies respiratoires des chevaux, mais aucune étude n'a jusqu'à présent comparé les différentes méthodes et lieux de prélèvements.

Dans cette étude, un examen clinique et respiratoire approfondi ainsi que de nombreux prélèvements respiratoires ont été réalisés sur 166 chevaux. Ces prélèvements incluaient notamment un lavage trachéal (LT) et deux lavages broncho-alvéolaires (LBA) par cheval. Des analyses cytologiques, bactériologiques, virologiques et mycologiques ont ensuite été réalisées.

Les éléments fongiques étaient très fréquemment présents dans le lavage trachéal des chevaux, aussi bien lors de cytologie (76,6%) que de culture fongique (82,5%). Ils étaient plus rares dans le mélange des lavages broncho-alvéolaires des deux poumons, et étaient présents chez 20,5% des chevaux lors de cytologie, et chez 22,8% des chevaux lors de culture fongique.

Quel que soit le lieu de prélèvement, et malgré des prévalences comparables, l'accord entre ces deux méthodes est très faible. Par ailleurs, la présence d'un LT positif résulte plus probablement d'une contamination par les poussières issues de l'environnement, ce qui n'est pas observé pour le LBA. Ainsi, ce prélèvement est plus pertinent que le LT pour la détection des moisissures.

**MOTS CLES :**

- Cheval
- Équidé
- Appareil respiratoire
- Moisissures
- Lavage trachéal
- Lavage broncho-alvéolaire
- Cytologie
- Étude expérimentale

**DATE DE SOUTENANCE** : 24 Octobre 2023