



HAL
open science

Vaccination contre les entérites néonatales du veau : comparaison de la réponse induite par deux vaccins avec des adjuvants différents

Bérénice Mathey

► **To cite this version:**

Bérénice Mathey. Vaccination contre les entérites néonatales du veau : comparaison de la réponse induite par deux vaccins avec des adjuvants différents. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03882110

HAL Id: dumas-03882110

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03882110v1>

Submitted on 2 Dec 2022

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.

VACCINATION CONTRE LES ENTERITES NEONATALES DU VEAU : COMPARAISON DE LA REPONSE INDUITE PAR DEUX VACCINS AVEC DES ADJUVANTS DIFFERENTS

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

MATHEY Bérénice, Eléonore

Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :
M. Renaud MAILLARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Gilles FOUCRAS
M. Romain VOLMER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

A Monsieur le Professeur Renaud Maillard

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Hommages respectueux

A Monsieur le Professeur Gilles Foucras

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et guidée dans l'élaboration de ce travail.

Pour son encadrement, sa patience et la confiance qu'il m'a accordée dans ce travail.

Sincères remerciements

A Monsieur le Professeur Romain Volmer

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Microbiologie et infectiologie

Qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Mes plus sincères remerciements

A Javier Heras Sanchez, merci de nous avoir fait découvrir l'élevage bovin en Espagne et pour toute l'aide apportée lors des prélèvements.

A Christian Tasca, merci de nous avoir accompagnées jusqu'en Espagne et pour une patience infinie lors du conditionnement de nos échantillons.

A Blandine Gausserès, merci pour l'analyse de tous nos échantillons.

A Guillaume Tabouret, pour les analyses statistiques de nos résultats, merci.

A Sébastien Geollot et Thibault Devambe, pour l'aide à la mise en place de ce projet, sincères remerciements.

A Annaëlle, merci d'avoir été ma binôme dans ce travail de longue haleine, je n'y serais pas arrivée sans ton soutien.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
TABLE DES TABLEAUX.....	13
INTRODUCTION	15
I. PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1) Les entérites néonatales	17
a. Définition et description clinique.....	17
b. Facteurs de risques et prévention	23
i. Facteurs infectieux	24
ii. Facteurs environnementaux	33
iii. Facteurs liés au veau	36
c. Prévention vaccinale	39
2) Mécanismes de la réponse immunitaire en lien avec la vaccination	42
a. Développement de la réponse cellulaire	42
b. Développement de la réponse anticorps	46
c. Méthodes d'évaluation de la réponse vaccinale.....	49
3) Vaccins et vaccination.....	51
a. Les différents types de vaccins.....	51
b. Les adjuvants : nature, activité	55
c. Vaccination et mécanismes de protection attendus.....	59
II. PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE	62
1) Contexte et motivations de l'étude.....	62
2) Matériel et méthodes	63
a. Animaux	63
b. Description des vaccins utilisés et leur AMM	64
c. Échantillons	65
i. Nature des échantillons	65

ii.	Préparation et conditionnement.....	68
iii.	Conservation et transport des prélèvements.....	69
d.	Méthodes analytiques	69
e.	Analyses statistiques	71
3)	Résultats.....	71
a.	Statut des vaches avant vaccination	71
i.	Analyse sérologique pour la constitution des groupes	71
ii.	Réponse anticorps avant la vaccination	72
iii.	Réponse cellulaire avant la vaccination	73
b.	Réponse immunitaire induite chez la vache	76
i.	Anticorps	76
ii.	Immunité cellulaire et cytokines	76
c.	Réponse immunitaire induite chez le veau.....	80
III.	DISCUSSION.....	82
	CONCLUSION.....	86
	BIBLIOGRAPHIE.....	88
	ANNEXES.....	93

Liste des abréviations

ACF : Adjuvant complet de Freund

ADCC : Cytotoxicité dépendante des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIF : Adjuvant incomplet de Freund

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide ribonucléique

BCoV : Coronavirus bovin

BCR : B-cell receptor

BRV : Rotavirus bovin

BS : BOVIGEN SCOUR®

BVDV : Bovine viral diarrhea virus

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CO₂ : Dioxyde de carbone

ConA : Concanavaline A

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CTL : Contrôle

Cu : Cuivre

DIVA : Differentiating infected from vaccinated animals

EAEC : *Escherichia coli* entéroagressive

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique

EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasive

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ENN : Entérite néonatale

EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogène

ETEC : *Escherichia coli* entérotoxinogène

γ-GT : Gamma-glutamyltranspeptidase

GTV : Groupement technique vétérinaire

IFN γ : Interféron gamma

Ig / IgA / IgD / IgE / IgG / IgM : Immunoglobuline / de type A / de type E / de type D / de type G / de type M

IL-x : Interleukine x

IM : Intramusculaire

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

LTc : Lymphocyte T cytotoxique

LTh : Lymphocyte T helper

MFI : Mean fluorescence intensity

MN : MULTIMINTM

NK : Natural killer

O₂ : Dioxygène

OLS : Organe lymphoïde secondaire

pH : Potentiel hydrogène

PLSDA : Partial least square discriminant analysis

PRR : Pattern recognition receptor

RC / RV : BOVILIS ROTAVEC CORONA®

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

SC : Sous-cutané

Se : Sélénium

STa / STb : Entérotoxine thermostable a / b de *Escherichia coli*

STEC : *Escherichia coli* productrice de shiga-toxine

TCR : T-cell receptor

TNF : Facteur de nécrose tumorale

YOPI : Young, old, pregnant, immunocompromised

Zn : Zinc

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Fréquence des entérites néonatales en fonction de l'âge des veaux (Coura et al., 2015).....	17
Figure 2 : Creux immunitaire (Ravary, Sattler and Roch, 2006)	18
Figure 3 : Modèle schématique d'un rotavirus (Source : https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/VIRUS_ROTAVIRUS.pdf)	27
Figure 4 : Modèle schématique d'un coronavirus (Source : http://www.dmipfmv.ulg.ac.be/virovet/m/bovins/bovin_dig.pdf)	29
Figure 5 : Cycle biologique de <i>Cryptosporidium</i> sp. (source : http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/protozooses/site/html/1.html)	31
Figure 6 : Cycle biologique de <i>Giardia</i> sp. (Smith et al., 2007)	32
Figure 7 : Cycle biologique de <i>Eimeria</i> sp. (Source : Les coccidioses intestinales des ruminants, P. Jacquet, 2014)	32
Figure 8 : Sensibilité des veaux à divers agents entéropathogènes en fonction de leur âge (d'après Ravary, Sattler and Roch, 2006; Ridremont, 2021)	33
Figure 9 : Taux de transfert des anticorps colostraux au cours des 48 premières heures de vie (Ravary, Sattler and Roch, 2006)	37
Figure 10 : Évolution des anticorps en immunofluorescence indirecte dans le lait des vaches (Vanopdenbosch et al., 1981).....	38
Figure 11 : Évolution des anticorps sériques en immunofluorescence indirecte anti-rotavirus (Vanopdenbosch et al., 1981).....	40
Figure 12 : Activation des LT CD4 en LT helpers (d'après Tizard, 2013)	43
Figure 13 : Schéma bilan de la réponse cellulaire avec l'exemple d'une infection virale	45
Figure 14 : Cinétique de la réponse cellulaire (Bradley, Holm and Tanaka, 2014)	46
Figure 15 : Schéma de la conformation d'une immunoglobuline (d'après Clos, 2012).....	47
Figure 16 : Lymphocytes B mémoire et réponse lors d'une seconde infection par un pathogène (Abbas, 2003).....	48
Figure 17 : Différentes méthodes de traitement des virus pour produire un vaccin (Tizard, 2013).....	55

Figure 18 : Réponse immunitaire induite par un vaccin DTPC (diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche) avec ou sans adjuvant (modèle porcin) (Polewicz et al., 2013)	56
Figure 19 : Séroconversion induite en fonction de la quantité d'antigène dans un vaccin influenza aviaire H5N1, avec ou sans adjuvant (modèle humain) (Leroux-Roels et al., 2007)	57
Figure 20 : Principe de fonctionnement du système Luminex xMAP (Source : https://hhd.psu.edu/bbh/outreach-service/biomarker-core-laboratory/bcl-services/biomarker-testing/luminex-xmap-platforms)	70
Figure 21 : Analyses sérologiques à J0 vis-à-vis de BRV et BCoV.....	73
Figure 22 : Analyse intégrative de la réponse cellulaire aux différents ligands (J0)	74
Figure 23 : Réponses cellulaires des groupes avant vaccination : exemple pour 4 cytokines.	75
Figure 24 : Analyse sérologique à J28 vis-à-vis de BRV et BCoV.....	76
Figure 25 : Réponse cellulaire des groupes à J0 et J28 : exemple vis-à-vis de IFN γ	77
Figure 26 : Réponse cellulaire à J28 : exemple vis-à-vis de IFN γ et CCL4	78
Figure 27 : Réponse cellulaire à J28 : exemples vis-à-vis de 3 cytokines avec le ligand BCoV	79
Figure 28 : Analyse PLSDA vis-à-vis du ligand BCoV, du ligand BRV et du ligand ConA.....	79
Figure 29 : Analyse factorielle multiple pour les ligands ConA et BCoV.....	80
Figure 30 : Réponses cellulaires des veaux et des mères : exemple pour 3 cytokines.....	81

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Probabilité de survie d'un veau à diarrhée en fonction de l'intensité du réflexe de succion (Messand, Duthu and Becker, 2019)	19
Tableau 2 : Évaluation clinique du degré de déshydratation d'un veau (d'après Ravary, Sattler and Roch, 2006 et Smith, 2019)	21
Tableau 3 : Appréciation clinique du degré d'acidose métabolique chez des veaux de plus d'une semaine d'âge (d'après Ravary, Sattler and Roch, 2006)	22
Tableau 4 : Toxines produites par les différents types de clostridies (Cho and Yoon, 2014)..	25
Tableau 5 : Caractéristiques des vaccins utilisés dans l'étude	65
Tableau 6 : Échantillons prélevés au cours de l'étude	66
Tableau 7 : Conditionnement des échantillons de l'étude.....	68
Tableau 8 : Taux de positivité des échantillons en fonction du pourcentage d'inhibition (Source : Bio-X Diagnostics)	72
Tableau 9 : Effet des ligands sur la réponse cellulaire (Temps J0)	74

Introduction

Le problème des entérites néonatales chez les veaux est bien connu et très documenté. Selon les études, l'accent n'est pas porté sur les mêmes aspects de ces affections polyfactorielles, ce qui implique des données inconstantes, autant sur le plan de sa définition que des données épidémiologiques en termes d'étiologies, de morbidité et de mortalité, ainsi que sur les conséquences économiques qui s'ensuivent. Quoi qu'il en soit, le principal moyen médical de prévention reste la vaccination des vaches gravides, associé à une bonne distribution du colostrum aux nouveau-nés. Les différents types de vaccins connus pour cette prévention semblent d'efficacité équivalente.

Notre objectif était de comparer différents vaccins disponibles sur le marché français, qui diffèrent entre eux par la composition, surtout sur la nature de l'adjuvant utilisé. Les résultats sur la réponse immunitaire induite semblent équivalents, sur la base de la réponse anticorps qu'ils permettent, sans que la réponse cellulaire, que les adjuvants utilisés sont capables de stimuler de façon plus ou moins forte, n'ait été réellement étudiée. Notre étude a pour but d'analyser le type et l'efficacité de la réponse immunitaire induite lors d'une vaccination des mères contre les entérites néonatales des veaux en fonction de l'adjuvant présent dans le vaccin. Il s'agit de déterminer si la nature de l'adjuvant influence le type de réponse immunitaire produite chez la mère et si cette composition est susceptible d'orienter cette réponse vers un type ou un autre. Ceci est une information d'intérêt en vaccinologie, pour la production de futurs vaccins avec des adjuvants capables d'orienter la réponse immunitaire en fonction du type de réponse visé.

La vaccination est une problématique quotidienne dans la pratique vétérinaire. En effet, elle est souvent refusée par les éleveurs car jugée économiquement non ou trop peu rentable, et non efficace dans la gestion de certaines maladies. Elle doit être réalisée en respectant un protocole précis et être intégrée dans une conduite d'élevage adaptée, avec de bonnes conditions d'hygiène et, dans le cas présent, associée à une bonne distribution du colostrum aux veaux à la naissance.

Les entérites néonatales (ENN), dont l'un des principaux symptômes est la diarrhée, constituent la première cause de morbidité et de mortalité chez les veaux de moins d'un mois. Leur étiologie est très diverse : virale, bactérienne, parasitaire, nutritionnelle, environnementale, souvent plurifactorielle. Les principaux agents pathogènes identifiés comme responsables des ENN sont les rotavirus, le coronavirus, les *Escherichia coli* entérotoxigènes et *Cryptosporidium parvum*. Leur implication varie en fonction de l'âge du veau, ce qui peut guider la recherche de l'étiologie de la diarrhée lorsqu'elle est observée. Les données de prévalence des différents pathogènes diffèrent beaucoup en fonction des études. Ceci peut être expliqué par la diversité des modes d'élevage et des conditions climatiques qui varient en fonction des saisons, des pays ainsi que des méthodes de diagnostic utilisées pour les mettre en évidence, avec des valeurs de sensibilité et spécificité qui ne sont pas identiques entre méthodes et entre tests (Ammar et al., 2014).

Cette étude contribue indirectement à la question du bien-être animal puisqu'elle s'intéresse aux protocoles vaccinaux qui peuvent être utilisés de sorte à protéger au mieux les jeunes veaux vis-à-vis de maladies très invalidantes. Plus largement, elle contribue aussi au bien-être de l'éleveur, indissociable de celui de ses animaux. En effet, les ENN entraînent des pertes économiques souvent élevées en élevage si l'on considère la surmortalité dans le troupeau, le coût des traitements et la dégradation des performances de production tels que le gain moyen quotidien du veau et sa susceptibilité accrue à d'autres infections (Rocha et al., 2017). Ces maladies causent très directement une augmentation du temps de travail des éleveurs par les soins qui doivent être prodigués aux veaux malades et constituent donc un facteur de stress non négligeable.

I. Partie 1 : étude bibliographique

1) Les entérites néonatales

a. Définition et description clinique

Les entérites néonatales désignent un ensemble de maladies qui concernent les veaux nouveau-nés, c'est-à-dire les veaux âgés de 0 à 30 jours. Elles touchent plus particulièrement les veaux vers l'âge de 1 à 2 semaines (**Figure 1**) (Coura et al., 2015). Elles sont très courantes dans les élevages bovins, le plus souvent d'origine infectieuse (bactérienne, virale ou parasitaire), quelquefois nutritionnelle, et souvent plurifactorielles, ce qui rend leur maîtrise complexe et difficile (Cho and Yoon, 2014). Par ailleurs, on note fréquemment une implication de l'environnement, de la conduite d'élevage et de la nutrition (Coura et al., 2015). On sait notamment que ces affections sont plutôt observées en hiver (de décembre à avril), lorsque les animaux sont en stabulation (Millemann and Maillard, 2007).

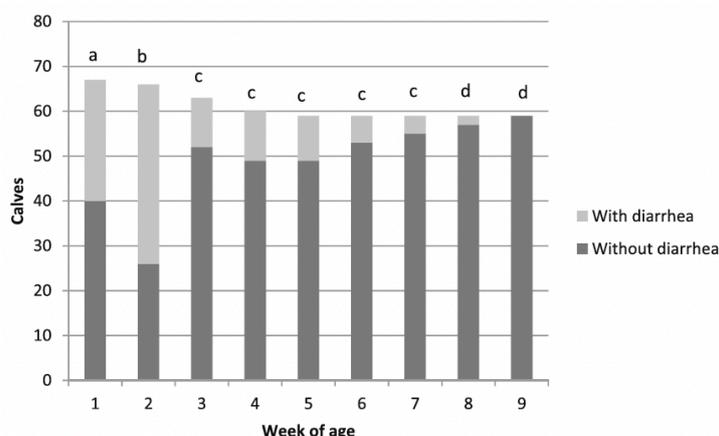


Figure 1 : Fréquence des entérites néonatales en fonction de l'âge des veaux (Coura et al., 2015)

La contamination se produit en général au contact de la mère ou des autres veaux (Boileau and Kapil, 2010), et d'autant plus lors de l'introduction de nouveaux animaux dans le même lot. Le temps d'incubation et la sévérité des signes cliniques sont en général exacerbés chez les animaux les plus jeunes, en particulier ceux dont le transfert de l'immunité passive n'est pas satisfaisant (Boileau and Kapil, 2010). La diarrhée est également plus sévère lors d'une co-

infection par plusieurs agents pathogènes (Renaud, 2021). Plusieurs études ont démontré que la prévalence de la diarrhée était plus grande dans la 2^e semaine de vie (Bartels et al., 2010; Coura et al., 2015), d'où l'importance d'une bonne conduite d'élevage durant la période périnatale afin de limiter ces maladies et leurs conséquences sur la survie ou la croissance de l'animal, et pour l'éleveur en termes économiques et de temps de travail. Cette période de sensibilité, appelée creux immunitaire, s'explique notamment par une baisse de la concentration des anticorps hérités de la mère au cours de la première semaine de lactation, associée à un système immunitaire du veau certes fonctionnel mais qui est encore naïf vis-à-vis de ces agents (**Figure 2**).

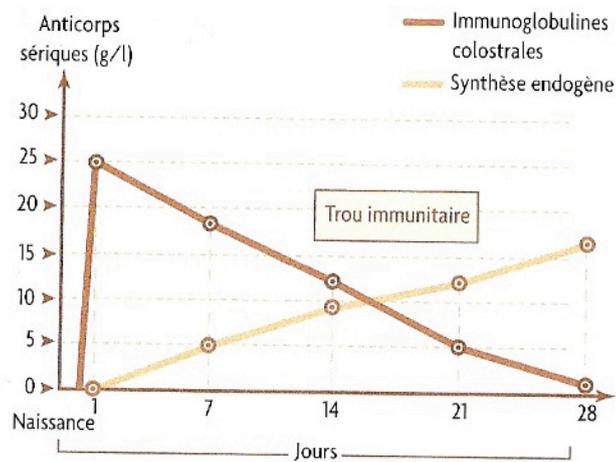


Figure 2 : Creux immunitaire (Ravary, Sattler and Roch, 2006)

Les entérites se caractérisent tout d'abord par l'apparition de la diarrhée, qui est définie comme une augmentation du volume des matières fécales ainsi qu'une modification de leur consistance qui devient plus liquide. L'aspect, l'odeur et le contenu de la diarrhée dépend plus ou moins de l'étiologie : elle peut être plus ou moins aqueuse, contenir ou non du sang, du mucus ou de la fibrine. Cette diarrhée peut avoir pour origine deux mécanismes : une hypersécrétion due à l'action d'entérotoxines ou une malabsorption due à des lésions des entérocytes (Ravary, Sattler and Roch, 2006). Le dérèglement du microbiote intestinal occasionné peut également causer un excès de fermentation entraînant une maldigestion.

Les signes cliniques associés sont les suivants : déshydratation, abattement, hyper- ou hypothermie, réflexe de succion diminué voire absent, perte de poids, hypotension. Dans des

cas graves, on peut également mettre en évidence une bradycardie et/ou une arythmie cardiaque, et au plan biologique, une acidose et une hyperkaliémie, qui conduisent à un coma voire à la mort si la diarrhée est sévère et non traitée (Boileau and Kapil, 2010). Lors de l'examen clinique, il ne faut pas considérer uniquement la diarrhée, mais chercher si le veau présente d'autres signes d'infection que ce soit au niveau ombilical, pulmonaire ou articulaire, ce qui pourrait indiquer le développement d'une septicémie et donc un pronostic plus défavorable. Une étude présentée aux Journées Nationales des GTV à Nantes en 2019 a permis de démontrer que lors de diarrhée isolée, le seul facteur pronostic de la survie à 15 jours est la qualité du réflexe de succion (Messand, Duthu and Becker, 2019) (**Tableau 1**). D'après cette enquête, l'âge du veau, sa température rectale, son pH sanguin et l'enophtalmie qu'il présente au moment de la première visite n'ont aucune valeur pronostique.

Tableau 1 : Probabilité de survie d'un veau à diarrhée en fonction de l'intensité du réflexe de succion (Messand, Duthu and Becker, 2019)

Intensité du réflexe de succion	Probabilité de survie	Intervalle de confiance
Normal	1	[0,86 ; 1,0]
Diminué	0,91	[0,76 ; 0,98]
Absent	0,33	[0,12 ; 0,62]

Ainsi, lors d'une visite, l'examen clinique du veau diarrhéique vise non seulement à évaluer son état et le traitement à adopter, mais il permet également au praticien d'évaluer le pronostic vital du veau. Des modèles plus complexes ont été décrits mais ils ne sont pas utilisés en pratique, notamment car les informations disponibles ne sont pas aussi bonnes que celles qui ont été utilisées pour développer ces modèles (Messand, Duthu and Becker, 2019). Quoi qu'il en soit, indépendamment du pronostic, la survie du veau dépend avant tout du traitement réalisé : un traitement inadapté ou une absence de traitement peuvent considérablement diminuer la probabilité de survie du veau. L'évolution est assez rapide, en quelques heures ou quelques jours tout au plus, que ce soit pour l'amélioration de l'état clinique, ou au contraire pour sa dégradation, voire la mort.

En histologie, on peut mettre en évidence une atteinte des entérocytes à différents étages de l'intestin selon l'agent pathogène responsable. Le remplacement des entérocytes étant lent chez les nouveau-nés, ceux-ci sont alors plus susceptibles de présenter une diarrhée persistante car il y a compétition entre la prolifération de l'agent pathogène, le remplacement des entérocytes (Coura et al., 2015) et la restauration des fonctions digestives.

Pour évaluer la gravité de l'atteinte, on commence par apprécier la déshydratation en établissant un score de déshydratation clinique, puisque c'est le premier paramètre qui doit être corrigé (**Tableau 2**).

Lorsque les troubles acido-basiques sont plus sévères, avec notamment le développement d'une acidose, une analyse des gaz sanguins (pH sanguin, pressions partielles en O₂ et CO₂, taux de bicarbonates sériques) est informative pour le choix du traitement et la composition du soluté à administrer. Le veau a souvent un pH sanguin diminué, associé à un taux en bicarbonates plus faible, du fait de l'excrétion augmentée dans les fèces. En pratique, toutes les cliniques ne disposent pas d'un analyseur adapté ou ne peuvent pas faire d'analyse au chevet du patient. On peut donc, à partir d'une appréciation clinique, estimer la sévérité de l'acidose à l'aide de divers paramètres auxquels on attribue un score (**Tableau 3**). Ce score est compris entre 0 et 13.

On peut également réaliser une analyse biochimique du sang, qui permet de détecter une hypoglycémie, une hyperlactatémie, une hyperurémie, une hyperkaliémie ou une hypomagnésémie.

L'étiologie précise de la diarrhée est assez peu recherchée en pratique en première intention, car cette information n'est pas de nature à modifier significativement le traitement. Cependant, l'hypothèse de l'implication de certains agents pathogènes peut être faite sur la base de la classe d'âge affectée (dont le détail sera présenté page 31, **figure 8**), la morbidité et la mortalité dans le cheptel.

Tableau 2 : Évaluation clinique du degré de déshydratation d'un veau (d'après Ravary, Sattler and Roch, 2006 et Smith, 2019)

Pourcentage de déshydratation (%) et sévérité	Enfoncement des yeux (mm)	Persistance du pli de peau (sec)	Réflexe de succion	Température rectale (°C)	État général	Muqueuses
0%	Aucun	<1	Normal	> 38,5	Normal, extrémités chaudes	Humides, chaudes
1-5%, léger	2-4	2-4	Diminué	38,5	Légère dépression, extrémités tièdes	Collantes à sèches
6-8%, modéré	4-6	5-10	Diminué à absent	38,5	Dépression marquée, décubitus sternal, extrémités froides	Collantes à sèches
9-10%, sévère	6-8	11-15	Très faible à absent	<38	Dépression sévère, décubitus latéral, extrémités glacées	Sèches, froides
>10%, fatal	8-12	Perte totale de l'élasticité	Absent	<37	Coma, extrémités glacées	Sèches, froides, cyanosées

Tableau 3 : Appréciation clinique du degré d'acidose métabolique chez des veaux de plus d'une semaine d'âge (d'après Ravary, Sattler and Roch, 2006)

Paramètre	Score	Interprétation
Enophtalmie	1	Légère séparation entre le globe oculaire et la membrane nictitante
	2	Séparation marquée entre le globe oculaire et la membrane nictitante
Réflexe de succion	0	Réflexe fort
	1	Réflexe faible mais coordonné
	2	Mâchouillage désorganisé
Réponse à la menace	3	Absence de réflexe
	0	Réflexe instantané normal
	1	Réflexe lent et retardé
Réponse tactile (pincement de la peau en région lombaire)	2	Absence de réflexe
	0	Mouvements cutanés et de la tête vers le flanc
Capacité à se lever et se maintenir debout	1	Mouvement cutané
	2	Absence de mouvement
Chaleur de la cavité buccale	0	Capacité sans assistance
	2	Incapacité sans assistance
Chaleur des extrémités	0	Température normale
	1	Muqueuses fraîches
	2	Muqueuses froides
Chaleur des extrémités	0	Température normale
	1	Peau fraîche
	2	Peau froide

Score clinique = somme des scores de chaque paramètre (0 à 13)

La première mesure à prendre avant de débuter un traitement est d'isoler les animaux malades de sorte à limiter au maximum la contamination des animaux encore sains. Les entérites néonatales étant fréquemment virales, les traitements que l'on peut mettre en place sont essentiellement des traitements de support visant à corriger les pertes hydriques et donc la déshydratation, les déséquilibres électrolytiques, l'acidose, l'hypoglycémie et l'hypothermie (Boileau and Kapil, 2010). Le traitement de base consiste donc en une réhydratation adaptée en fonction du déficit estimé au moment de l'examen clinique. Il faut s'assurer de la suite de la prise en charge par l'éleveur. Sur les cas sévères, la réhydratation se

fait d'abord par administration intraveineuse de solutés polyioniques, puis le relais est pris par l'éleveur avec un traitement par voie orale. Cela permet de rétablir le réflexe de succion assez rapidement pour que la réhydratation puisse être ainsi réalisée. En effet, certains éleveurs ne savent pas ou ne veulent pas sonder les veaux et le biberonnage est impossible après disparition du réflexe de succion (Messand, Duthu and Becker, 2019). L'alimentation lactée ne doit pas être arrêtée trop longtemps, au risque de provoquer de nouveaux troubles digestifs lors de sa réintroduction. En outre, les apports énergétiques ne sont pas couverts par les réhydratants oraux habituellement utilisés.

L'antibiothérapie ne doit pas être employée de façon systématique ; elle doit être raisonnée au cas par cas afin de contribuer à la réduction de l'usage de ces molécules dans le contexte de prévention de l'antibiorésistance (**Annexe 1**). Elle peut être cependant nécessaire lorsque le risque de septicémie est élevé.

A la réhydratation, on associe fréquemment l'utilisation de pansement digestif. On y trouve de l'argile, du kaolin, du kaopectate, du charbon végétal, de la smectite ou encore de l'hydroxyde d'alumine. Ils permettent de tapisser le tube digestif afin de réduire l'absorption de toxines, ce qui permet une cicatrisation de ce dernier. Ces pansements permettent également de ralentir le transit et de limiter les pertes hydriques.

Dans le cas d'un veau présentant, en plus de la diarrhée, une atteinte systémique, on peut administrer des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Cela permet notamment de diminuer les signes de douleur abdominale et peut favoriser la prise de nourriture.

b. Facteurs de risques et prévention

La prévalence de chacun des agents pathogènes associés aux entérites néonatales dépend beaucoup du pays dans lequel l'étude est réalisée, mais également de la saison (Safavi, 2012). Cela peut s'expliquer par des modes d'élevage et des climats différents, des échanges entre animaux plus ou moins importants. Les méthodes de diagnostic utilisées dans les diverses études ne sont pas toujours identiques ; elles n'ont pas la même sensibilité, ni la même

spécificité pour la détection des agents pathogènes, ce qui peut induire ces disparités dans les valeurs de prévalence obtenues (Lotfollahzadeh et al., 2020).

i. Facteurs infectieux

Les pathogènes les plus fréquents impliqués dans les entérites néonatales sont *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus et *Cryptosporidium parvum*. Avec le développement des méthodes de diagnostic, de nombreux autres virus, bactéries et parasites ont pu être identifiés comme étant responsables de ces affections.

- Bactéries

On retrouve les colibacilles, les salmonelles et les clostridies.

Escherichia coli est un des premiers agents étiologiques de la diarrhée néonatale à avoir été identifié. Ce sont des bacilles à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ces bactéries appartiennent au microbiote normal de l'intestin et sont retrouvées dans une grande partie des cas d'entérites néonatales. Les souches pathogènes peuvent être classées en six groupes : *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), *E. coli* productrices de shiga-toxine (STEC), *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), *E. coli* entéroinvasives (EIEC), *E. coli* entéroagressives (EAEC) et *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) (Coura et al., 2015). Le groupe le plus fréquemment associé à la diarrhée néonatale chez le veau est le groupe des ETEC. Ces bactéries produisent deux types de facteurs de virulence : des entérotoxines thermostables (STa, STb) et un facteur d'adhésion F5 (autrefois appelé K99) (Cho and Yoon, 2014) que l'on recherche lorsqu'on souhaite identifier la présence de ce biotype (Foster and Smith, 2009). Les veaux sont sensibles à cette infection surtout dans les quatre premiers jours de vie mais on peut retrouver des ETEC chez des veaux plus âgés lors de co-infections (Coura et al., 2015). Après ingestion et passage à travers la caillette, où le pH compris entre 4 et 6 est défavorable à leur survie, les ETEC infectent l'épithélium intestinal, en particulier dans l'iléon où le pH est supérieur à 6,5, condition pour l'expression du facteur d'adhésion F5. Elles se multiplient à la surface des villosités intestinales, ce qui entraîne l'atrophie de celles-ci (Foster and Smith, 2009). Une fois installées, les bactéries sécrètent leurs entérotoxines ce qui induit une augmentation de la

sécrétion d'ions chlorure par les cellules des cryptes dans la lumière de l'intestin. Le déséquilibre osmotique créé attire de l'eau dans la lumière intestinale, entraînant une diarrhée aqueuse sécrétoire (Smith, 2019).

Les salmonelles, *Salmonella enterica*, sont fréquemment retrouvées lors de diarrhée dans la période néonatale. Les sérovars les plus souvent rencontrés sont Thyphimurium et Dublin. Ces bactéries infectent assez rarement les veaux âgés de moins de 3 semaines. La transmission se fait par voie orale, éventuellement *via* le colostrum ou le lait, ou depuis un environnement contaminé (une contamination de surface de la mamelle, des outils utilisés pour l'entretien des locaux ou pour l'alimentation, *via* un transport humain). Les salmonelles colonisent la muqueuse intestinale, ce qui crée une inflammation sévère, et se multiplient par la suite dans les tissus lymphoïdes. Les veaux ont alors une diarrhée aqueuse et mucoïde avec de la fibrine, des fragments de muqueuse et du sang (Cho and Yoon, 2014). Les infections par des salmonelles s'accompagnent parfois d'une endotoxémie, entraînant des modifications des paramètres cardio-pulmonaires (tachypnée, tachycardie) et hématologiques (leucopénie en début d'évolution, puis leucocytose) (Smith, 2019). Il ne faut pas négliger l'aspect zoonotique de ce pathogène.

Enfin, *Clostridium perfringens*, une bactérie Gram + anaérobie, peut parfois contribuer à l'apparition de diarrhée. Ces bactéries peuvent être divisées en 5 types en fonction des toxines qu'elles excrètent (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Toxines produites par les différents types de clostridies (Cho and Yoon, 2014)

Type	Toxines produites
A	α
B	α, β, ϵ
C	α, β
D	α, ϵ
E	α, ι

Le type C est le plus couramment retrouvé dans les fèces de veaux avec une entérite. Cela reste un pathogène moins fréquent qu'*E. coli*. Les conditions de développement propices à ce type d'entérite sont associées à un environnement riche en nutriments permettant le développement des bactéries et une motilité réduite du tube digestif. De ce fait, le risque de contamination peut être augmenté par la composition de l'aliment lacté distribué aux veaux, mais aussi par le mode de distribution (grands volumes administrés en une seule fois, ce qui ralentit la vidange de la caillette). Ce pathogène entraîne une entérite nécrotico-hémorragique diffuse ou multifocale. Les clostridies produisent des exotoxines qui ont des répercussions systémiques importantes, avec une évolution souvent défavorable à court terme.

- Viraux

Trois virus peuvent provoquer de la diarrhée chez le veau : le rotavirus bovin (BRV), le coronavirus bovin (BCoV) et de façon moindre le virus de la BVD (Bovine Viral Diarrhea).

Le rotavirus bovin (BRV), qui fait partie de la famille des *Reoviridae*, est un virus non enveloppé en forme de roue qui possède 11 segments d'ARN double brin codant pour 6 protéines structurales (VP1 à VP4, VP6, VP7) et 6 protéines non structurales (NSP1 à NSP6) (Gomez and Weese, 2017) (**Figure 3**). Ce génome est contenu dans une capsidie icosaédrique composée de trois couches protéiques concentriques (ANSES, 2012). Elles permettent aux rotavirus de résister dans le milieu extérieur pendant plusieurs mois à moins de 5°C, mais aussi et surtout dans les fèces jusqu'à 9 mois. Cette survie relativement longue est favorable au maintien du virus dans les locaux d'élevage d'une saison de vêlage à l'autre en l'absence de nettoyage et désinfection (Smith, 2019). Il existe 7 sérogroupes (A à G), mais le groupe A constitue la cause majeure des infections à rotavirus chez les animaux domestiques (Bartels et al., 2010; Coura et al., 2015). Les rotavirus du groupe A peuvent être classés plus précisément selon le génotype de deux protéines de la capsidie : VP4 est une protéine protéase sensible qui détermine le type P, et VP7 est une glycoprotéine qui définit le type G (ANSES, 2012; Cho and Yoon, 2014). On recense 16 types G et 27 types P chez les animaux domestiques. Les combinaisons possibles entre ces deux types ont pour conséquence un nombre considérable de souches, avec une répartition limitée à une région, mais quelquefois aussi avec une

répartition mondiale. Les génotypes les plus fréquents à l'échelle mondiale chez les bovins sont G6P[5], G6P[11] et G10P[11] (Alkan et al., 2010; Badaracco et al., 2013; Papp et al., 2013; Collins et al., 2014; Rocha et al., 2017; Bertoni et al., 2020). En France, le génotype le plus fréquent est G6P[5] (Kaplon et al., 2013).

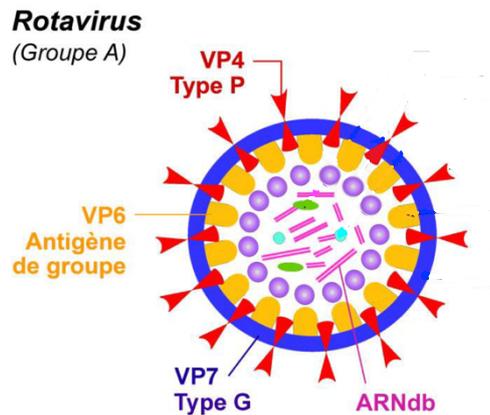


Figure 3 : Modèle schématique d'un rotavirus
(Source : https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/VIRUS_ROTAVIRUS.pdf)

Plus de 90% des vaches non vaccinées sont porteuses d'anticorps dirigés contre les rotavirus, ce qui indique une circulation très active du virus dans la population bovine (Foster and Smith, 2009).

Les rotavirus sont isolés des fèces d'animaux malades mais également de ceux d'animaux sains. La prévalence à l'échelle de l'élevage est équivalente entre élevage sain et élevage avec des entérites néonatales. Cela suggère que l'association avec un autre pathogène est nécessaire pour causer l'apparition des symptômes (Bolon et al., 2013).

La diarrhée provoquée par un rotavirus apparaît en général chez des veaux de 1 à 2 semaines. La voie de contamination est fécale-orale. La période d'incubation est de 12 à 24 heures avant l'apparition d'une diarrhée marquée à sévère. Les veaux infectés sont en général excréteurs pendant 3 à 7 jours après le début des symptômes, tandis que la phase symptomatique dure en moyenne 5 à 9 jours (Smith, 2019). La réplication du virus a lieu dans le cytoplasme des

cellules épithéliales matures à l'endroit des villosités de l'intestin grêle, et provoque la lyse de celles-ci avec comme conséquence une atrophie des villosités intestinales. La diminution de la surface d'absorption conduit à une diminution de l'absorption des nutriments (osides, acides-aminés...) par exemple. Cela crée un gradient osmotique inverse et l'appel d'eau dans la lumière intestinale (Foster and Smith, 2009). Il y a aussi la libération de composants vasoactifs qui activent le système nerveux entérique et la sécrétion d'une entérotoxine virale (NSP4). Celle-ci semble avoir un pouvoir pathogène plus important que les lésions de l'épithélium elles-mêmes, d'où la maldigestion et la malabsorption comme causes principales de la diarrhée provoquée par cet agent (Ciarlet, 2001). En histologie, on peut également remarquer des lésions des nœuds lymphatiques mésentériques telles qu'une déplétion des follicules lymphoïdes associée à un dépôt de fibrine dans le cortex et la médulla (Singh et al., 2020).

Le coronavirus bovin (BCoV) est un virus enveloppé à ARN positif simple brin qui code quatre protéines de structure qui lui confèrent son immunogénicité : une glycoprotéine de membrane (M), une glycoprotéine de péplomère (aussi appelée Spike, S), une protéine de nucléocapside (N) et une glycoprotéine hémagglutinine-estérase (HE) (Bok et al., 2015) (**Figure 4**). Tous les isolats ne sont pas identiques à travers le monde et sont parfois assez éloignés des souches vaccinales utilisées (Gunn et al., 2015). C'est un virus qui est peu résistant dans l'environnement (de l'ordre de 3 jours dans le sol, les fèces et la litière) et est sensible aux désinfectants usuels (Boileau and Kapil, 2010). Comme le souligne R. Maillard, dans l'introduction du Bulletin des GTV n°101 (mars 2021), les coronaviroses présentent un polymorphisme clinique et épidémiologique considérable. En effet, chez les bovins, ce virus peut provoquer des formes cliniques aussi diverses qu'une entérite dans la période néonatale, que la dysenterie d'hiver des bovins adultes et des signes respiratoires dus à une pneumonie interstitielle. On suppose aussi qu'une transmission entre espèces est possible (Bok et al., 2015).

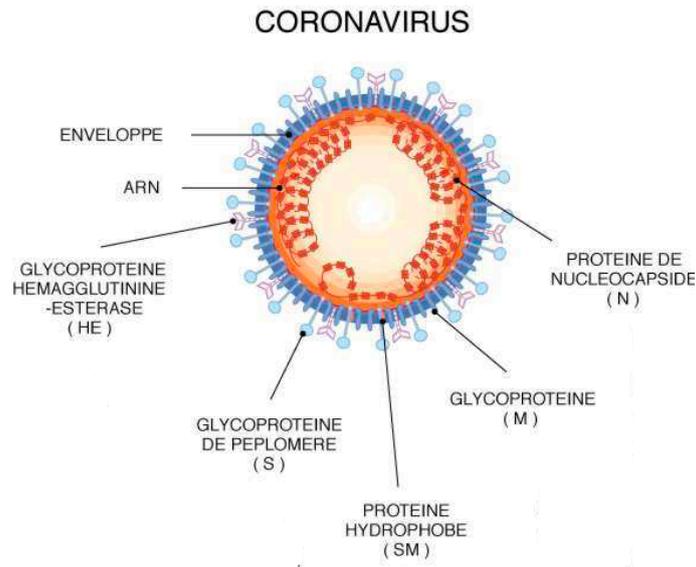


Figure 4 : Modèle schématique d'un coronavirus
(Source :

http://www.dmipfmv.ulg.ac.be/virovet/m/bovins/bovin_dig.pdf)

La séroposivité vis-à-vis du coronavirus est extrêmement fréquente et les vaches sont généralement porteuses d'anticorps vis-à-vis du coronavirus. Le mode de transmission est fécal-oral et dans une moindre mesure par voie respiratoire (Boileau and Kapil, 2010). L'incubation dure de 20 à 36 heures (Ridremont, 2021). Un veau infecté par le coronavirus, le plus fréquemment entre 1 et 2 semaines de vie, présente une entérocolite muco-hémorragique (Boileau and Kapil, 2010). L'infection débute en général dans le duodénum, mais se propage rapidement à tous les étages de l'intestin (Foster and Smith, 2009). Le virus se réplique dans les cellules épithéliales matures des villosités de l'intestin grêle, mais surtout dans les cellules épithéliales des cryptes, et y compris quelquefois dans le gros intestin et jusqu'au rectum. Dea, Roy et Elazhary (1981) rapportent que, à l'autopsie, les lésions macroscopiques sont des ulcères de la muqueuse buccale et œsophagienne, une paroi intestinale amincie, œdémateuse et parfois ulcéreuse avec un contenu liquide, jaunâtre et mucoïde. En histologie, on peut aussi observer un contenu nécrotique dans les cryptes (Singh et al., 2020). Dans les nœuds lymphatiques mésentériques, dont la capsule est épaissie, les follicules lymphoïdes sont nécrotiques. La réplication du virus induit la mort des cellules épithéliales, d'où un effacement des villosités et donc une diarrhée de malabsorption (Boileau and Kapil, 2010). Contrairement aux autres pathogènes responsables d'entérite néonatale, le

coronavirus affecte donc les cryptes, ce qui explique la plus longue durée de l'atteinte clinique. La période clinique dure en moyenne 4 à 6 jours, puis les animaux rétablis cliniquement peuvent encore être excréteurs pendant plusieurs semaines, dans les fèces ou les sécrétions nasales (Ridremont, 2021).

Le virus de la BVD (BVDV, Bovine Viral Diarrhea virus) est un virus enveloppé à ARN positif simple brin qui fait partie des *Pestivirus*. Il peut entraîner une diarrhée essentiellement lors d'infection d'un veau né d'une mère séronégative, très tôt après la naissance.

On peut également citer d'autres virus dont l'implication dans les diarrhées néonatales a été mise en évidence plus récemment : le torovirus, un virus à ARN enveloppé qui fait partie de la famille des *Coronaviridae*, le norovirus ou encore le nebovirus, des virus à ARN non enveloppés, qui sont tous deux de la famille des *Caliciviridae*. Bien que reconnus comme pathogènes, les études ne sont pas encore en mesure d'affirmer s'ils le sont pris isolément ou lors de co-infection (Gomez and Weese, 2017). Ils ne sont pas recherchés en routine pour déterminer l'étiologie de la diarrhée.

- Parasitaires

Les affections parasitaires associées à la diarrhée néonatale sont principalement la cryptosporidiose, la giardiose et la coccidiose.

Dans le premier mois de vie, on peut mettre en évidence *Cryptosporidium parvum*, un protozoaire commun chez les bovins, qui est zoonotique. Les veaux ingèrent des ookystes qui, à la suite de l'exposition aux sécrétions gastriques et sels biliaires, libèrent les sporozoïtes qui pénètrent dans les entérocytes (particulièrement ceux de l'iléon) (Foster and Smith, 2009) (**Figure 5**). Ceci entraîne une modification de la paroi intestinale : diminution du nombre de microvillosités, rétrécissement des cellules épithéliales cylindriques, conduisant à une atrophie sévère des villosités. Cependant, les mécanismes qui conduisent à la mort des cellules épithéliales lors d'une infestation par *C. parvum* ne sont pas encore compris. Quoi qu'il en soit, l'absorption est rendue déficiente du fait de la réduction du nombre de cellules épithéliales villositaires matures et donc de la densité de transporteurs. Ceci occasionne une

diarrhée de malabsorption (Cho and Yoon, 2014).

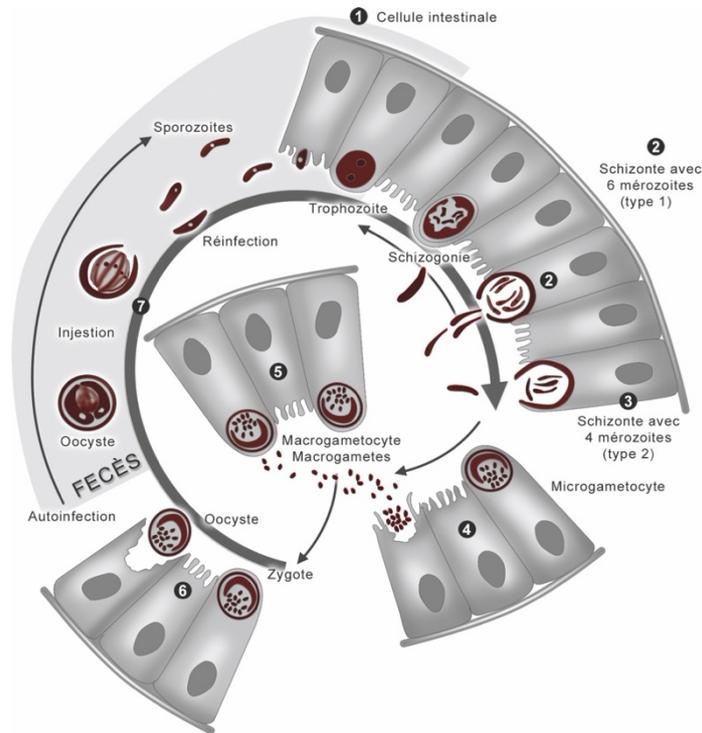


Figure 5 : Cycle biologique de *Cryptosporidium* sp. (source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/protozooses/site/html/1.html>)

La mortalité associée à cette parasitose est faible, mais la morbidité peut être très élevée dans un cheptel (Ravary, Sattler and Roch, 2006). De plus, c'est un parasite relativement résistant dans l'environnement ; il est en outre résistant à la plupart des désinfectants. La faune sauvage peut constituer un réservoir avec un rôle épidémiologique jugé important (Smith, 2019).

Les giardies, dont *Giardia duodenalis*, peuvent être retrouvées dans les fèces de veaux avec de la diarrhée, le plus souvent en association avec un autre pathogène (**Figure 6**). Les veaux infectés sont au moins âgés de plusieurs semaines, généralement 1 à 2 mois (Smith, 2019). La diarrhée est d'ordinaire peu sévère malgré l'atrophie des villosités qui peut être observée et la baisse d'activité enzymatique de l'intestin. Ainsi, malgré son faible pouvoir pathogène, on peut tout de même supposer que la giardiose a un impact sur la bonne croissance du veau (Foster and Smith, 2009).

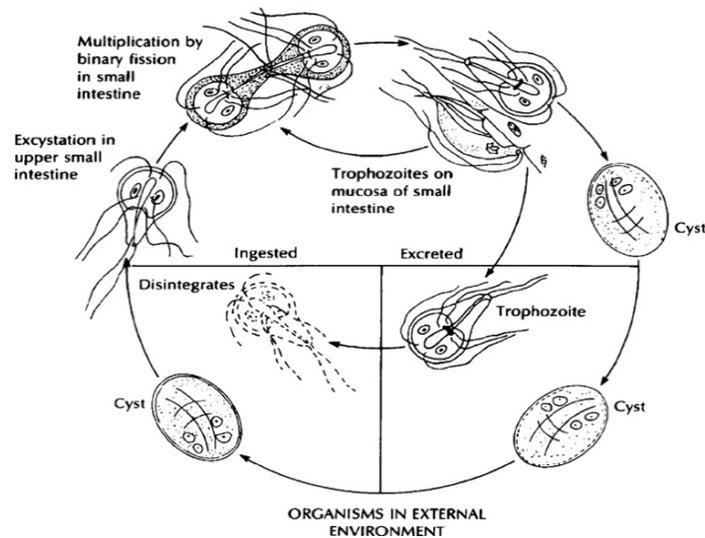


Figure 6 : Cycle biologique de *Giardia* sp. (Smith et al., 2007)

Les coccidies, dont *Eimeria bovis* et *Eimeria zurnii* qui sont les plus fréquentes et pathogènes chez les bovins, conduisent à une infestation clinique chez des veaux un peu plus âgés, exceptionnellement avant la 3 ou 4^e semaine de vie. Ces parasites infestent les veaux lorsqu'il fait chaud, contrairement aux pathogènes présentés précédemment (Ravary, Sattler and Roch, 2006). En effet, ces conditions de température favorisent la sporulation des oocystes. Les schizontes et gamontes créent une atteinte de la muqueuse de l'iléon, du caecum et du côlon, notamment dans les cryptes (**Figure 7**).

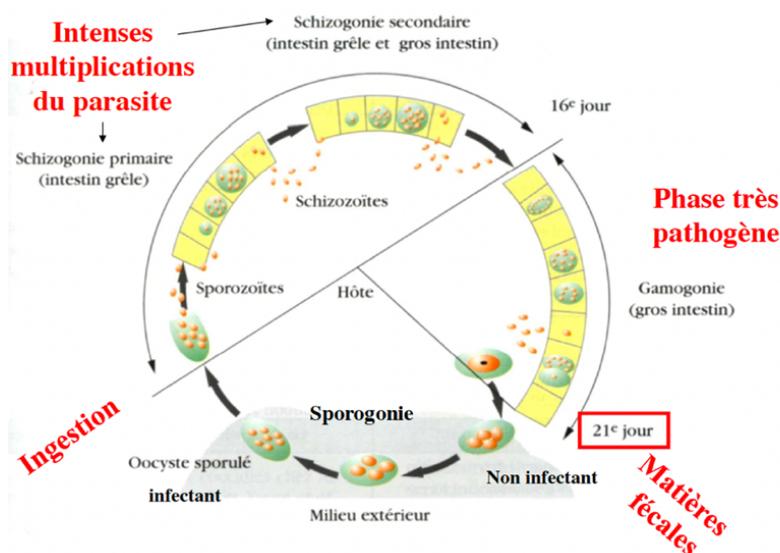


Figure 7 : Cycle biologique de *Eimeria* sp. (Source : Les coccidioses intestinales des ruminants, P. Jacquet, 2014)

En résumé, la **figure 8** permet de voir l'incidence des différents pathogènes présentés en fonction de l'âge du veau :

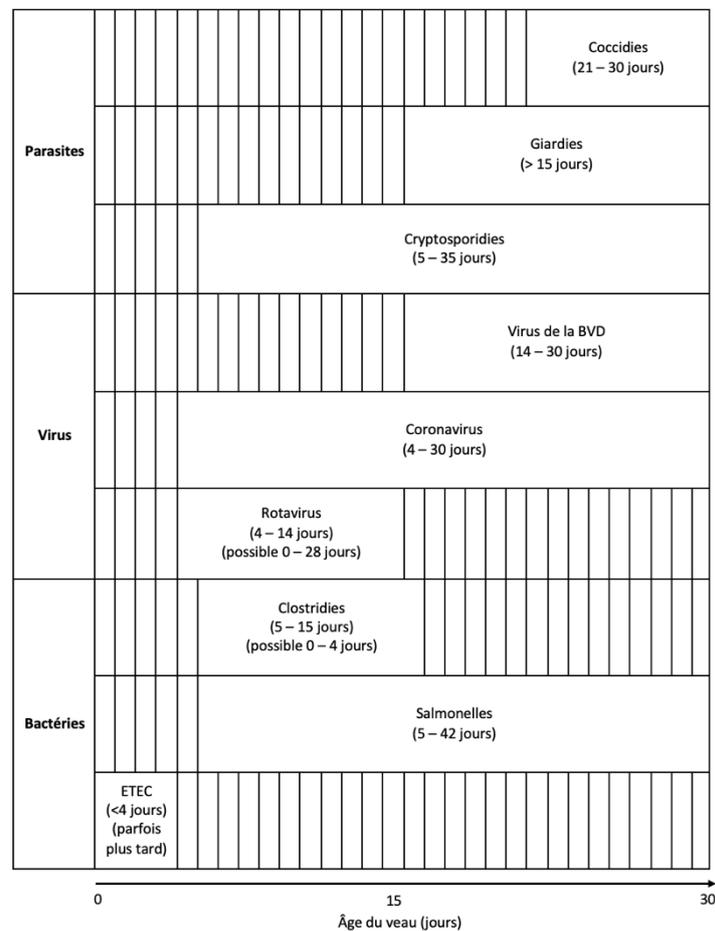


Figure 8 : Sensibilité des veaux à divers agents entéropathogènes en fonction de leur âge (d'après Ravary, Sattler and Roch, 2006; Ridremont, 2021)

ii. Facteurs environnementaux

Les conditions optimales de vie pour un veau nouveau-né sont un environnement protégé des conditions météorologiques défavorables (vent, pluie, exposition au soleil sans ombre à la saison chaude) et une litière propre et sèche (Boileau and Kapil, 2010). Le défaut de qualité du paillage des cases abritant les veaux a été reconnu comme un des facteurs de risque du développement de la diarrhée due aux rotavirus, coronavirus et cryptosporidies (Lacroute et al., 2014). Le renouvellement de l'air dans le local doit être suffisant et sans courant d'air, ce qui est permis par une ventilation, statique ou mécanique, adaptée du bâtiment. Idéalement,

la naissance doit avoir lieu dans un parc de mise-bas qui a été au préalable nettoyé et désinfecté, de sorte à éliminer au mieux les pathogènes susceptibles d'être présents. Lorsqu'un nettoyage-désinfection est réalisé, il faut de préférence que le bâtiment soit vide pendant un certain temps pour permettre l'assainissement, notamment car certains produits utilisés sont potentiellement nocifs par inhalation ou ingestion. Il est donc nécessaire d'effectuer un vide-sanitaire après la réalisation de ce protocole. Avant de désinfecter le bâtiment, il faut s'assurer d'avoir procédé à un nettoyage complet et d'avoir retiré toute la matière organique (le fumier), les désinfectants étant inactivés à son contact. On peut par exemple proposer, après un nettoyage complet, un protocole de désinfection utilisant du Virkon S™ dilué à 1%, par trempage ou pulvérisation, qu'on laisse agir pendant au minimum 10 minutes. Ce produit, à base de potassium monopersulfate, a une action virucide et bactéricide.

A la naissance, la désinfection du nombril, après avoir vidé les vaisseaux de leur contenu, doit être réalisée de façon systématique avec un désinfectant à base d'iode. Le trempage dans un contenant propre rempli de la solution antiseptique est souhaitable.

La taille des cheptels a tendance à augmenter et avec elle le nombre de vêlages dans des laps de temps relativement brefs ; contrairement parfois à la taille des bâtiments ou des aires où les animaux sont parqués. On se trouve alors dans des situations où la densité d'animaux est trop grande, ce qui est favorable à une forte contamination du milieu et une forte pression d'infection. En système allaitant par exemple, dans une stabulation avec une aire paillée intégrale, une surface d'environ 12m² par couple mère-veau est recommandée (Institut de l'élevage, 2008). Les animaux doivent également être séparés en lots constitués d'animaux d'âge équivalent, car les plus âgés sont fréquemment des porteurs sains de pathogènes et les transmettent aux plus jeunes qui se contaminent à leur contact, alors que leur réceptivité et sensibilité sont grandes car leur immunité est encore trop faible. Cette séparation permet en plus de limiter les « veaux voleurs », plus âgés, qui sont susceptibles de boire le colostrum à la place du nouveau-né (Chantreau and Amiot, 2013). Dans les élevages de grande taille, il convient d'adapter la main d'œuvre allouée à l'hygiène et aux soins des animaux. La surveillance des animaux ne doit pas être négligée, au risque de dégrader très rapidement l'état sanitaire global de l'élevage.

Les animaux malades doivent être isolés dans une infirmerie, qui doit être une zone propre et sèche. Les éleveurs, ainsi que toutes les personnes susceptibles d'intervenir dans l'élevage, doivent respecter des règles de biosécurité : principe de la marche en avant, avec la visite des animaux malades en dernier, nettoyage et désinfection du matériel (matériel de contention, d'alimentation, fourches, seaux, ...), nettoyage et désinfection des bottes, idéalement avec une tenue et du matériel spécifiques qui doivent être réservés aux soins des animaux malades.

La nutrition joue également un rôle important dans le développement de l'immunité. Il est recommandé de prodiguer une supplémentation oligo-minérale aux vaches, en particulier dans les semaines qui précèdent la mise-bas (sélénium, cuivre, zinc, iode). La ration doit être équilibrée tout au long de la gestation, pour avoir une note d'état corporel de 3,5 à la mise-bas : une vache sous-nutrie produira un colostrum de moins bonne qualité, tandis qu'une vache trop grasse pourra présenter des difficultés à la mise-bas. L'apport de concentrés au cours de la période de tarissement permet une augmentation de la concentration sérique en IgG chez la mère ainsi qu'une augmentation de la quantité de colostrum produite. Cependant, elle n'a pas d'influence sur la concentration en IgG du colostrum (Dunn et al., 2017).

Il faut s'assurer de la bonne alimentation des nouveau-nés. En effet, en particulier en système laitier, la préparation de l'aliment d'allaitement ou lactoreplaceur doit être effectuée dans de bonnes conditions (conditions de conservation de la poudre de lait, température de l'eau pour la reconstitution, quantité de poudre utilisée par volume d'eau, homogénéisation de la poudre). La composition des lactoreplaceurs doit être étudiée : certains ingrédients sont peu digestibles ou provoquent des allergies (Francoz and Nichols, 2017). Le volume de lait consommé par un veau doit également être adapté : un veau en bonne santé peut consommer jusqu'à 20% de son poids vif par jour, mais cette proportion diminue si le veau présente de la diarrhée (Smith, 2019). De l'eau d'abreuvement doit toujours être à disposition des animaux à volonté.

Chez la vache, le parasitisme constitue également un facteur à maîtriser : les infestations par *Fasciola hepatica* et de façon moindre par *Dicrocoelium lanceolatum* en particulier, bien que sans manifestation clinique le plus souvent, influent sur la qualité de l'immunité de la mère et par conséquent sur la qualité du colostrum produit (Ravary, Sattler and Roch, 2006). Il est donc

primordial de faire des analyses coproscopiques pour connaître l'état parasitaire du troupeau et ainsi adapter les traitements utilisés.

iii. Facteurs liés au veau

Chez les bovins, la placentation est dite épithélio-choriale. Les enveloppes fœtales constituent une barrière étanche qui empêche le transfert des anticorps de la mère au fœtus au cours de la gestation ; elles le protègent également du contact avec des antigènes exogènes. Le veau naît agammaglobulinémique et il est naïf vis-à-vis des divers agents pathogènes auxquels il est exposé après la naissance (Ravary, Sattler and Roch, 2006). La première protection est apportée par sa mère *via* l'ingestion du colostrum. La règle des 3 Q : « Qualité, Quantité, Quand » s'applique alors (Ridremont, 2021). Le colostrum distribué au veau doit avoir une concentration en IgG d'au moins 50g/L, à raison de 2 litres dans les deux heures suivant la mise-bas, avec un objectif de 4 litres dans les 12 premières heures de vie. Cela permet un passage d'anticorps maternels dans la circulation sanguine du veau. Puis, le passage à travers la barrière intestinale diminue à partir de 6 heures après la naissance pour ce qui concerne les IgG, la perméabilité étant un peu plus longue pour les IgM et IgA, jusqu'à disparaître complètement au-delà de 24 heures (**Figure 9**). L'ingestion du colostrum puis du lait permet cependant d'enrichir la lumière intestinale en anticorps et leucocytes protecteurs. Les anticorps empêchent l'adhérence des pathogènes à l'épithélium intestinal (Ravary, Sattler and Roch, 2006). La concentration des leucocytes dans le colostrum est estimée à 1×10^6 leucocytes/mL (Smith, 2019). L'immunité prodiguée par ce phénomène dépend de la concentration dans le colostrum puis dans le lait des anticorps et de la concentration sanguine de la mère, pour les anticorps spécifiques.

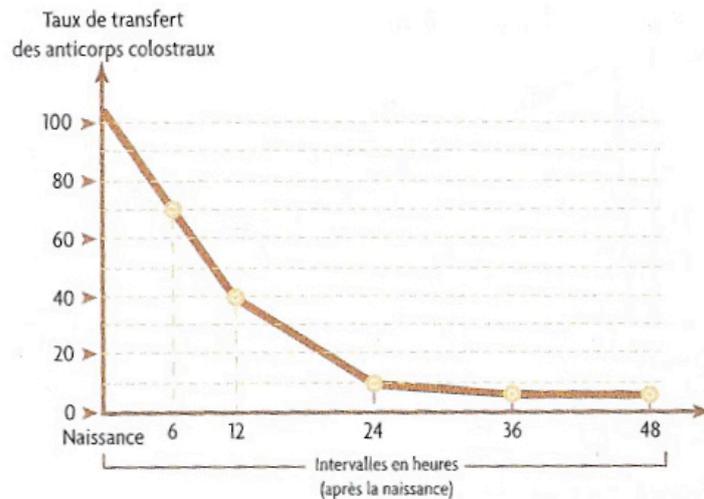


Figure 9 : Taux de transfert des anticorps colostraux au cours des 48 premières heures de vie (Ravary, Sattler and Roch, 2006)

En système laitier, il serait judicieux de continuer à distribuer une fraction du colostrum dans les premiers jours de vie avant la distribution de l'aliment d'allaitement. Cela permet de prolonger la présence d'anticorps dans la lumière intestinale et donc, en cas d'infection, une durée plus courte des symptômes et de l'excrétion de pathogènes (Fernandez, 1998). Castrucci et al. (1984) suggèrent même de substituer 200 mL du lait de la ration de base par du colostrum de première traite pendant toute la première semaine de vie, celui-ci étant plus riche en immunoglobulines. En effet, chez des veaux n'ayant pas consommé de colostrum à la naissance, on constate que la production d'IgM ne débute qu'après 4 jours de vie, tandis que les IgA et IgG n'atteignent des taux satisfaisants qu'à partir de 16 jours de vie au minimum, ce qui implique une fenêtre de sensibilité aux pathogènes bien plus grande chez ces animaux (Chase, Hurley and Reber, 2008). Malgré une large proportion de vaches séropositives pour rotavirus et coronavirus, chez les animaux non vaccinés, le titre des anticorps dans le lait diminue très rapidement à des taux très faibles et non protecteurs (Gomez and Weese, 2017). Cette concentration peut être améliorée et prolongée dans le temps grâce à la vaccination des mères, dans l'objectif de stimuler leur immunité et d'augmenter la production d'anticorps spécifiques. Des études ont permis de bien montrer son intérêt (Vanopdenbosch et al., 1981) (**Figure 10**).

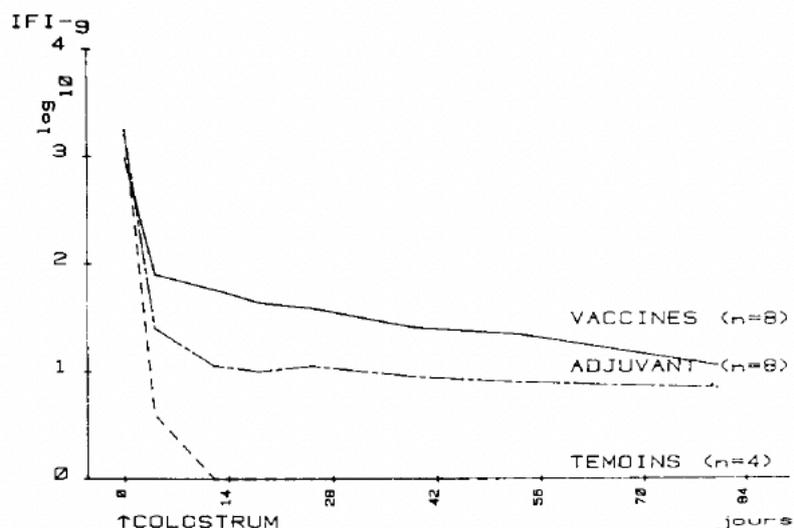


Figure 10 : Évolution des anticorps en immunofluorescence indirecte dans le lait des vaches (Vanopdenbosch et al., 1981)

Dans certains cas, le colostrum produit par la vache est de mauvaise qualité ou produit en trop faible volume. Pour remédier à cela, il est judicieux de constituer une banque de colostrum congelé de bonne qualité provenant de vaches en bonne santé et dont la production excède le besoin du veau. Ce colostrum peut être décongelé au bain marie à une température inférieure à 45°C lorsqu'il doit être utilisé. Le respect de cette température maximale permet d'éviter l'altération des protéines et des immunoglobulines.

Il est possible d'évaluer la qualité du transfert colostrale de l'immunité en dosant la quantité des protéines totales dans le sérum des veaux. Plus la concentration est élevée, moindre sera la sensibilité du veau aux infections (Renaud, 2021). On estime que la concentration sérique minimale des IgG chez un veau âgé de 48h doit être de 10 g/L, ce qui correspond à une concentration sérique en protéines totales de 55 g/L environ (Guin and Maillard, 2018). L'évaluation du transfert de l'immunité passive peut être réalisée simplement à l'aide d'un réfractomètre digital et d'un échantillon de sérum du veau à tester, même si le veau présente un certain degré de déshydratation (jusqu'à 10%) (Renaud et al., 2018).

D'autres facteurs peuvent exercer une influence sur l'immunité du veau. On peut citer la dystocie qui crée un état de stress pour le veau dès la naissance. Il sera plus faible, peut avoir

souffert d'anoxie ou d'hypoxie et peut présenter de l'œdème de la tête et de la langue. La mère, quant à elle, peut rester couchée après la mise-bas ou peut refuser de laisser téter le veau à la suite d'une césarienne par exemple. Ces facteurs peuvent avoir un impact sur le volume de colostrum ingéré, ainsi que sur la durée entre la naissance et l'ingestion du colostrum. Cela réduit la probabilité que le transfert colostrale soit de qualité, en plus d'augmenter le risque d'hypothermie du veau, le rendant moins dynamique et plus sensible à divers agents pathogènes (Smith, 2019). En effet, le colostrum, en plus des facteurs immunitaires, est également riche en nutriments qui permettent au veau d'assurer la thermorégulation dans les premiers jours de vie, alors que ses réserves graisseuses sont en quantité faible.

Le poids du veau à la naissance constitue également un facteur de risque d'apparition de la diarrhée dans la période néonatale. Cela concerne les veaux de petit poids ou au contraire ceux dont le poids est élevé (dans les races allaitantes, <50kg ou > 65 kg). Pour les veaux dont le poids est grand, le risque de dystocie est accru avec les conséquences indiquées plus haut (Smith, 2019).

La parité de la mère entre également en jeu : morbidité et mortalité en lien avec les entérites néonatales sont plus grandes chez des veaux nés de mères primipares. Ceci s'explique par un risque accru de défaut de transfert de l'immunité passive chez les génisses (Safavi, 2012). Dans le cas d'une mise-bas gémellaire, la quantité de colostrum ingérée par chacun des deux veaux est également diminuée ou inégale entre les deux veaux.

c. Prévention vaccinale

Au-delà de la gestion de la mise-bas, d'une conduite d'élevage offrant un environnement le plus sain et adapté possible, il est possible d'optimiser la prévention des entérites néonatales par le biais de la vaccination. Vacciner les veaux dès la naissance semblerait la pratique la plus évidente. Cependant, des études utilisant des vaccins vivants administrés par voie orale à des veaux âgés de quelques heures seulement ont démontré l'inefficacité de cette méthode (Van Zaane, Ijzerman and De Leeuw, 1986). En effet, les anticorps d'origine maternelle présents dans le colostrum interfèrent avec l'activité du vaccin, ce qui empêche le développement

d'une immunité propre au veau. En revanche, des études ont montré l'intérêt primordial de la distribution d'un colostrum de bonne qualité, riche en immunoglobulines (d'isotype IgG1), en cytokines et en cellules immunitaires. L'effet du colostrum immun se traduit par un gain moyen quotidien élevé et une bonne croissance (Castrucci, 1988). Le colostrum doit être distribué au veau dès que possible après la naissance pour permettre un transfert de l'immunité passive avant que l'absorption à travers la barrière intestinale ne soit plus possible (environ 24 heures après la naissance). Pour améliorer la concentration du colostrum en anticorps spécifiques des agents pathogènes que le veau est susceptible de rencontrer, la vaccination des vaches peut être réalisée. Elle permet d'augmenter la synthèse d'anticorps chez la vache, comme le montre le graphique à la **figure 11** provenant d'une étude sur l'utilisation d'un vaccin contre le rotavirus (Vanopdenbosch et al., 1981). Dans cette étude, le vaccin utilisé contient une souche de rotavirus inactivée associée à un adjuvant huileux. Ce type d'adjuvant a été utilisé dans d'autres projets qui concernent des vaccins multivalents (*E. coli*, rotavirus et coronavirus) et montre des résultats probants sur la stimulation de la production d'anticorps dans le colostrum (Bellinzoni et al., 1989).

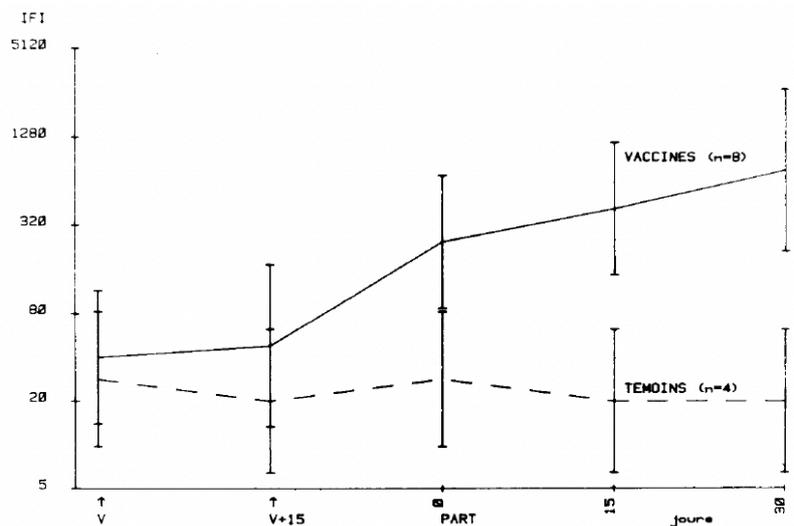


Figure 11 : Évolution des anticorps sériques en immunofluorescence indirecte anti-rotavirus (Vanopdenbosch et al., 1981)

V = jour de la vaccination, O = jour de la mise-bas et du rappel

Les vaccins disponibles sur le marché français les plus utilisés sont des vaccins inactivés multivalents, associant rotavirus, coronavirus et la bactérie ou l'adhésine F5 (anciennement K99) d'*E.coli*. Le protocole consiste en une injection intramusculaire unique entre la 12^e et la 3^e semaine avant la date présumée de la mise-bas (Résumé des Caractéristiques du Produit des vaccins BOVIGEN SCOUR[®] et BOVILIS ROTAVEC CORONA[®], **Annexes 2 et 3**), soit pendant la période de tarissement. La vaccination ne permet pas une protection complète, mais elle permet une diminution des symptômes et de la durée de la phase clinique. Elle doit être associée à une bonne gestion sanitaire du troupeau et une distribution adéquate du colostrum. Elle permet également de limiter le portage sain et l'excrétion des agents pathogènes.

Plusieurs études ont rapporté des divergences en fonction des isolats de coronavirus et de rotavirus présents dans les élevages et les souches utilisées dans les vaccins commerciaux, ce qui soulève la question de l'efficacité de ces vaccins. En effet, alors qu'on trouve dans les vaccins les sérotypes G6P[1] et G6P[5], on trouve parmi les isolats circulants les plus fréquents G6P[11] ou G10P[11] par exemple. Ainsi, pour espérer une protection maximale des veaux, les souches utilisées devraient être le plus proche possible des isolats présents dans les élevages. Cependant, cela impliquerait de changer de souches en permanence, celles-ci pouvant évoluer rapidement. (Alkan et al., 2010; Collins et al., 2014).

Tous les vaccins contre les ENN disponibles sur le marché français sont présentés en annexe (**Annexe 4**). On constate qu'il n'existe pas à ce jour de vaccin multivalent contenant tous les agents pathogènes responsables d'ENN, la protection assurée par ceux disponibles est donc nécessairement partielle, en fonction des agents les plus prévalents.

Lors de la mise en place d'un protocole vaccinal, il faut s'assurer auprès de l'éleveur qu'il est réalisé dans de bonnes conditions : matériel utilisé, contention des animaux, dose et voie d'administration, respect du calendrier de la vaccination par rapport au stade physiologique, conservation du vaccin (Chantreau and Amiot, 2013). De mauvaises pratiques pourraient être à l'origine d'un échec de vaccination.

2) Mécanismes de la réponse immunitaire en lien avec la vaccination

Dans le cadre de la vaccination, on s'intéresse en particulier à la réponse immunitaire adaptative, caractérisée par la possibilité d'une mémoire immunitaire. Elle comprend deux grands axes : la réponse cellulaire et la réponse humorale.

a. Développement de la réponse cellulaire

Lors de la vaccination, on introduit un ou plusieurs antigènes dans l'organisme. Ces antigènes sont reconnus par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) telles que les cellules dendritiques. Cette reconnaissance permet de déclencher la réponse immunitaire adaptative, qui prend le relais de la réponse immunitaire innée. Elle est permise grâce à des récepteurs situés à la surface de ces cellules, les PRR (Pattern Recognition Receptors). Les CPA dégradent ensuite les antigènes en peptides de petite taille qui sont associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II. Enfin, l'association CMH-peptide est exprimée à la surface de la CPA. Le CMH est un ensemble de glycoprotéines membranaires synthétisées dans le réticulum endoplasmique qui permet la présentation des antigènes aux lymphocytes T (LT). Elles ne sont pas stables tant qu'elles ne sont pas associées à un peptide. La stabilisation est assurée par des protéines chaperonnes en attendant la liaison à un peptide. Le CMH de classe I porte des peptides d'origine endogène (protéines virales ou bactériennes par exemple) et les présente aux LT CD8 tandis que le CMH de classe II porte des peptides d'origine exogène (virus, bactéries, parasites) et les présente aux LT CD4. Le CMH-I est également le marqueur du soi, qui présente des antigènes du soi aux lymphocytes T afin d'établir la tolérance aux antigènes du soi.

Les CPA migrent ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) par voie lymphatique où va se produire le contact avec des lymphocytes T, qui ont été produits dans la moelle osseuse et qui se sont différenciés en CD4 ou CD8 dans le thymus. Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et diverses chimiokines pour attirer les LT. La reconnaissance se fait à l'aide de récepteurs du lymphocyte T variables, les TCR (T-Cell Receptors), qui sont des glycoprotéines membranaires et qui sont spécifiques de complexes peptide-CMH.

Un premier type de reconnaissance se fait entre les lymphocytes T CD4+ naïfs et les complexes peptide-CMH-II exprimés par les cellules dendritiques. Elle se fait par sélection clonale : la CPA établit des liaisons transitoires avec les LT qu'elle rencontre jusqu'à ce qu'elle établisse un contact étroit et prolongé avec un LT qui a l'affinité la plus forte pour l'antigène présenté. Ceci permet l'activation du LT CD4, son amplification clonale, puis sa différenciation en cellule effectrice, les lymphocytes T auxiliaires (LTh pour helper), grâce à des cytokines telle qu'IL-2 et des chimiokines (**Figure 12**). Dans le cadre de la réponse cellulaire, les cellules effectrices produites sont en particulier les lymphocytes T helper de type 1 (LTh1), dont la caractéristique est d'exprimer la cytokine interféron gamma (IFN γ).

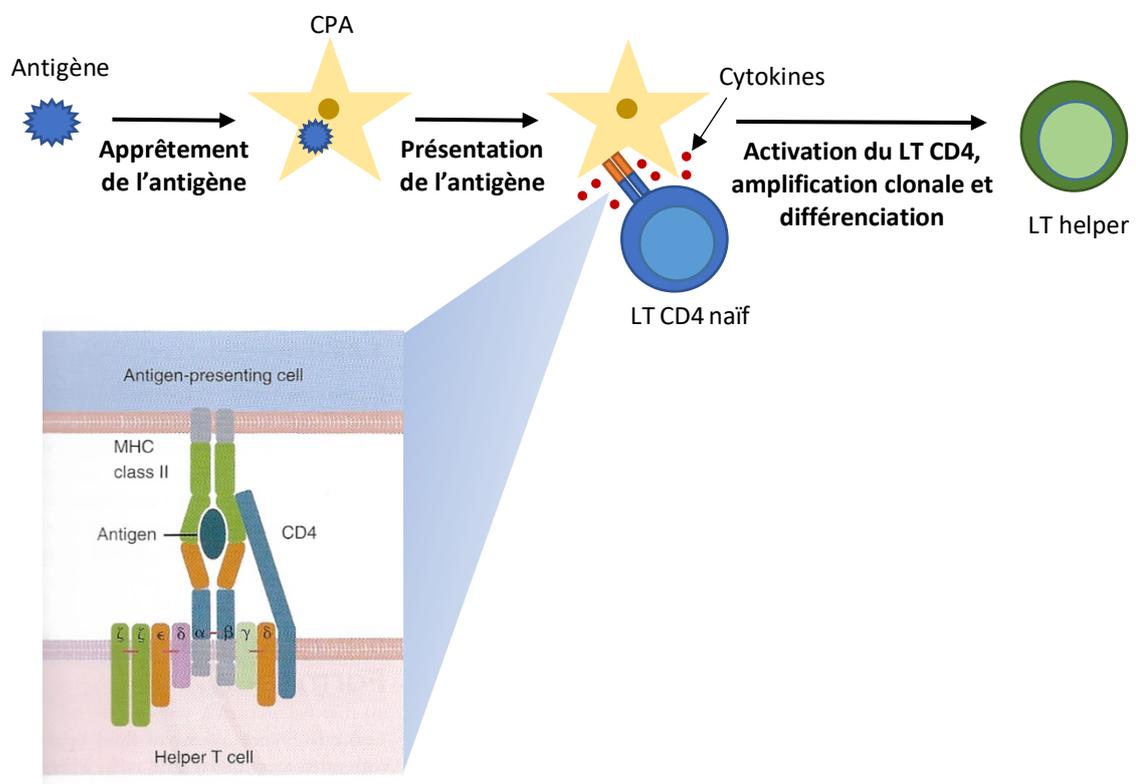


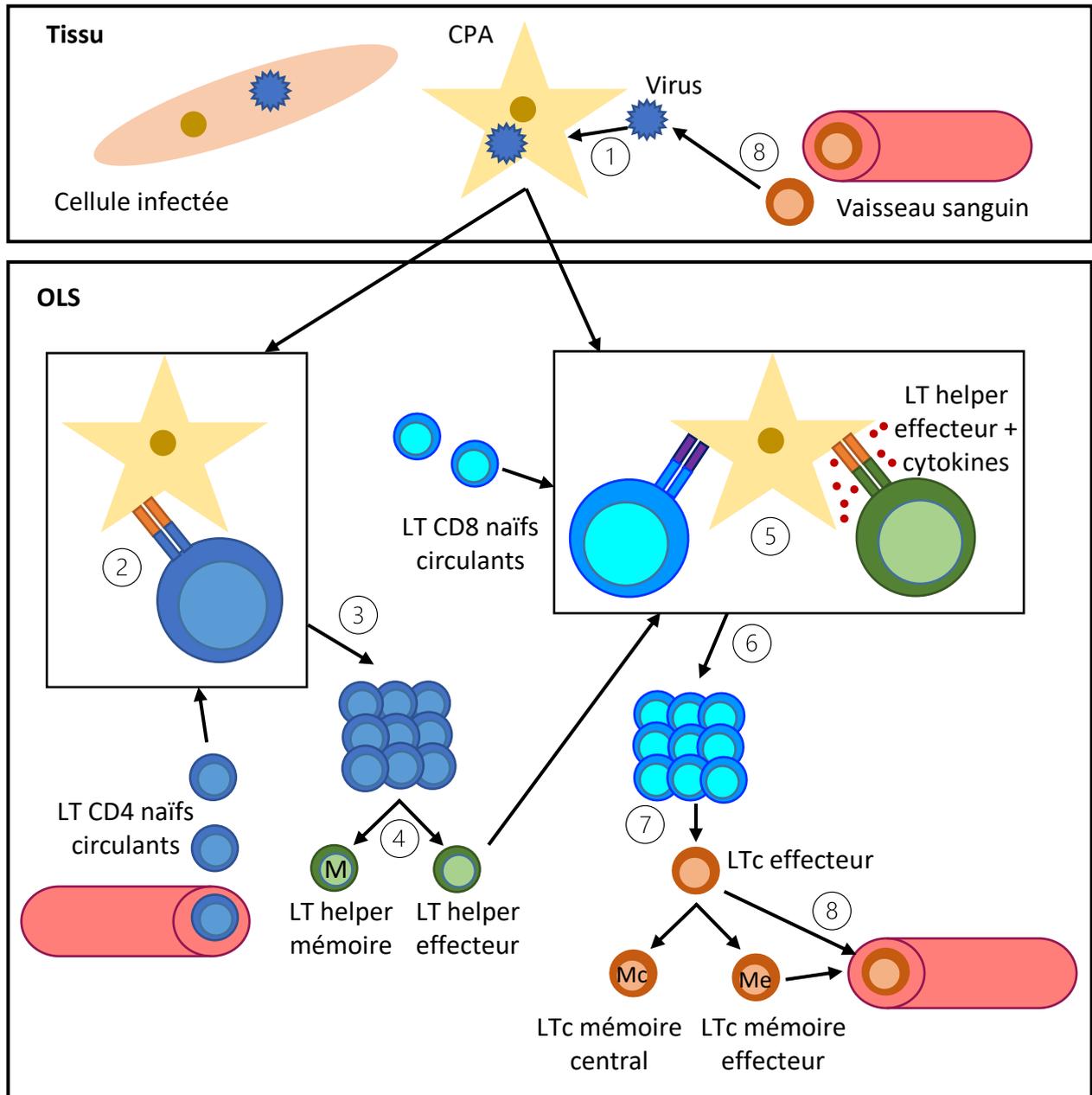
Figure 12 : Activation des LT CD4 en LT helpers (d'après Tizard, 2013)

Les LTh1 sécrètent à leur tour des cytokines, en particulier l'interféron gamma (IFN γ), IL-2, et TNF- α , qui vont favoriser l'expansion des lymphocytes T CD8+ naïfs, qui ont été activés par les complexes peptide-CMH-I, encore une fois avec une spécificité liée à l'antigène présenté. La coopération entre ces différentes cellules permet une amplification clonale des LT CD8, qui seront ensuite différenciés en lymphocytes T cytotoxiques (LTc). Les LTc rejoignent le torrent circulatoire par la voie lymphatique pour se rendre ultérieurement sur le site de l'infection ou

de l'injection vaccinale. Ils sont notamment attirés par les chimiokines CXCL9 et CXCL10. Ils reconnaissent l'antigène pour lequel ils sont spécifiques sur les cellules infectées. À la suite de cela, ils s'ancrent à cette cellule en formant une synapse et provoquent son apoptose grâce à une exocytose de granules lytiques. Ces granules contiennent de la perforine et des granzymes. Il existe également un autre mode de déclenchement de la mort de la cellule : la voie des récepteurs de mort, qui permettent l'activation des caspases, qui elles-mêmes déclenchent l'apoptose. Les LTc sécrètent également des chimiokines : CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 qui attirent les CPA, les LTh1 et d'autres LTc, ainsi que des cytokines dont IFN γ et TNF- α . Celles-ci permettent notamment l'activation des macrophages et des cellules Natural Killer (NK), qui est surtout la conséquence de l'activité des LTh.

Les LT CD8 peuvent également être différenciés en lymphocytes mémoire : les LTc mémoire effecteurs qui continuent de se multiplier et de circuler dans l'organisme, prêts à sécréter leurs granules lytiques en cas de nouvelle infection, et les LTc mémoire centraux qui restent dans l'organe lymphoïde secondaire (OLS) dans lequel ils ont été produits. C'est à partir de ces derniers que seront formés de nouveaux effecteurs lors d'une rencontre ultérieure avec le pathogène (**Figure 13**).

Une partie des LT helpers est destinée à former une population mémoire, qui permettra une réponse immunitaire plus rapide et plus ample lors d'un nouveau contact avec le pathogène. Comme pour les LTCD8, il existe des LTh mémoire centraux et les LTh mémoire effecteurs. Les premiers circulent dans les OLS. Ils sont inactifs mais leur activation sera rapide s'il y a une nouvelle infection. Les LTh mémoire effecteurs circulent en permanence dans les tissus et sont activables, de sorte à offrir une réponse immédiate en cas d'activation.



- ① Apprêtement de l'antigène
- ② Présentation de l'antigène
- ③ Amplification clonale
- ④ Différenciation
- ⑤ Présentation de l'antigène et sécrétion de cytokines par le LTh
- ⑥ Amplification clonale
- ⑦ Différenciation
- ⑧ Circulation dans l'organisme

Figure 13 : Schéma bilan de la réponse cellulaire avec l'exemple d'une infection virale

Lors de la première activation par un pathogène, natif ou vaccinal, les LTc mettent environ 1 semaine à se développer jusqu'à devenir détectables. Leur nombre augmente très rapidement, puis diminue une fois l'infection éteinte. Si on suit la courbe de leur concentration en fonction du temps, il existe ensuite un plateau, qui correspond aux LTc mémoire. Lors d'une

seconde infection, la concentration augmente plus vite et plus intensément, ce qui permet une élimination plus rapide du pathogène (**Figure 14**). Le retour au plateau précédemment décrit se fait ensuite plus lentement.

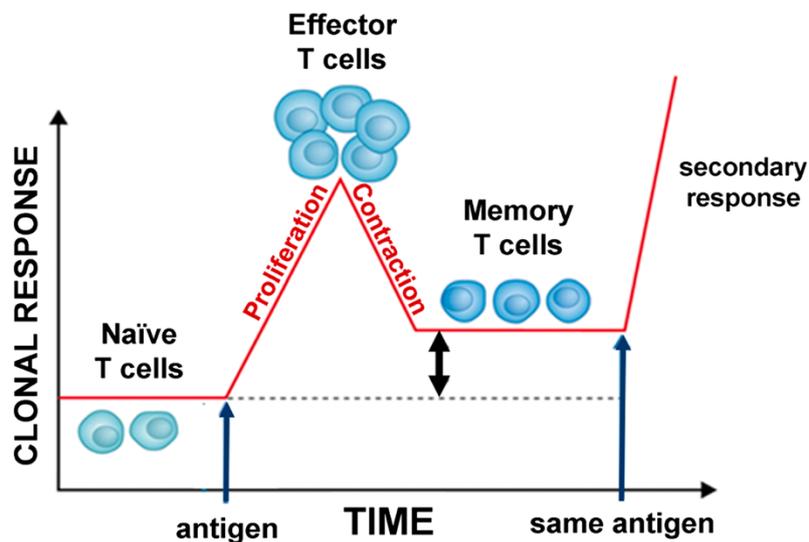


Figure 14 : Cinétique de la réponse cellulaire (Bradley, Holm and Tanaka, 2014)

b. Développement de la réponse anticorps

Pour la réponse anticorps, les cellules auxquelles on s'intéresse sont les lymphocytes B (LB). Produits dans la moelle osseuse, ils se déplacent ensuite dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires (OLS) où ils rencontrent les antigènes natifs. Ils se lient grâce aux récepteurs de surface qui sont des immunoglobulines IgM transmembranaires ou BCR (pour B-Cell Receptors). Les immunoglobulines sont des glycoprotéines globulaires composées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères reliées par des ponts disulfures et des interactions non covalentes (**Figure 15**). On trouve 5 classes circulantes dans l'organisme, en fonction de leur chaîne lourde : IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Les types majoritairement impliqués dans la réponse immunitaire adaptative sont les IgM, IgG et les IgA, les dernières intervenant surtout dans l'immunité mucoale. Les immunoglobulines reconnaissent les épitopes des antigènes grâce à leur paratope.

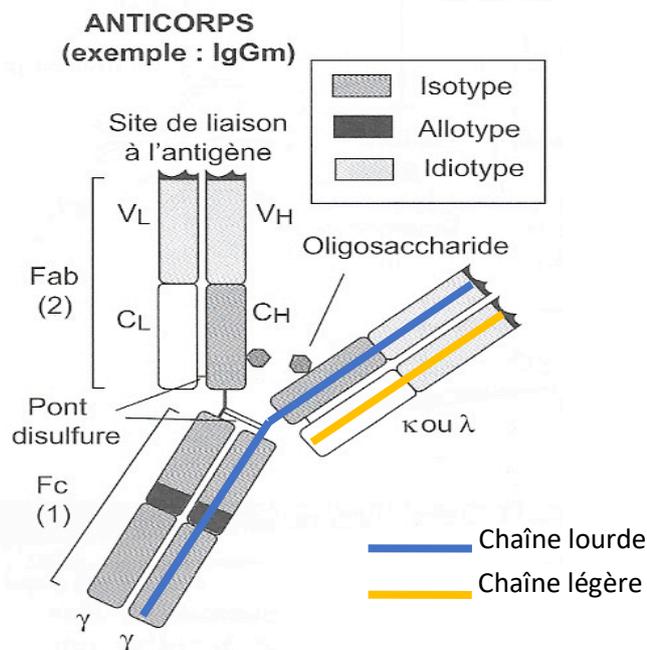


Figure 15 : Schéma de la conformation d'une immunoglobuline (d'après Clos, 2012)

Lorsque le LB mature naïf reconnaît un antigène, il l'internalise et associe des peptides produits de la dégradation de l'antigène protéique à une molécule du CMH-II. Ce complexe est alors présenté à un lymphocyte T folliculaire, qui est un type de LT helper. Celui-ci sécrète des interleukines : IL-2, IL-4, IL-10, et IL-21 par exemple. La reconnaissance entre ces deux cellules est appelée la sélection clonale. Elle permet l'activation du lymphocyte B et donc d'abord son amplification clonale, puis sa différenciation qui va produire des lymphocytes B mémoire ou des plasmocytes qui vont sécréter des IgM spécifiques des épitopes de l'antigène reconnu au départ.

Les lymphocytes B mémoire sont inactifs mais circulent dans l'organisme, en particulier dans l'OLS dans lequel ils ont été activés à la base. Ils sont associés à cette réponse immunitaire *via* la sécrétion d'immunoglobulines, celle-ci étant plus rapide et plus intense lors d'un nouveau contact antigénique (**Figure 16**). Ce sont les cellules que l'on souhaite induire lors d'une vaccination. Il existe également des plasmocytes mémoire qui sécrètent en permanence des immunoglobulines.

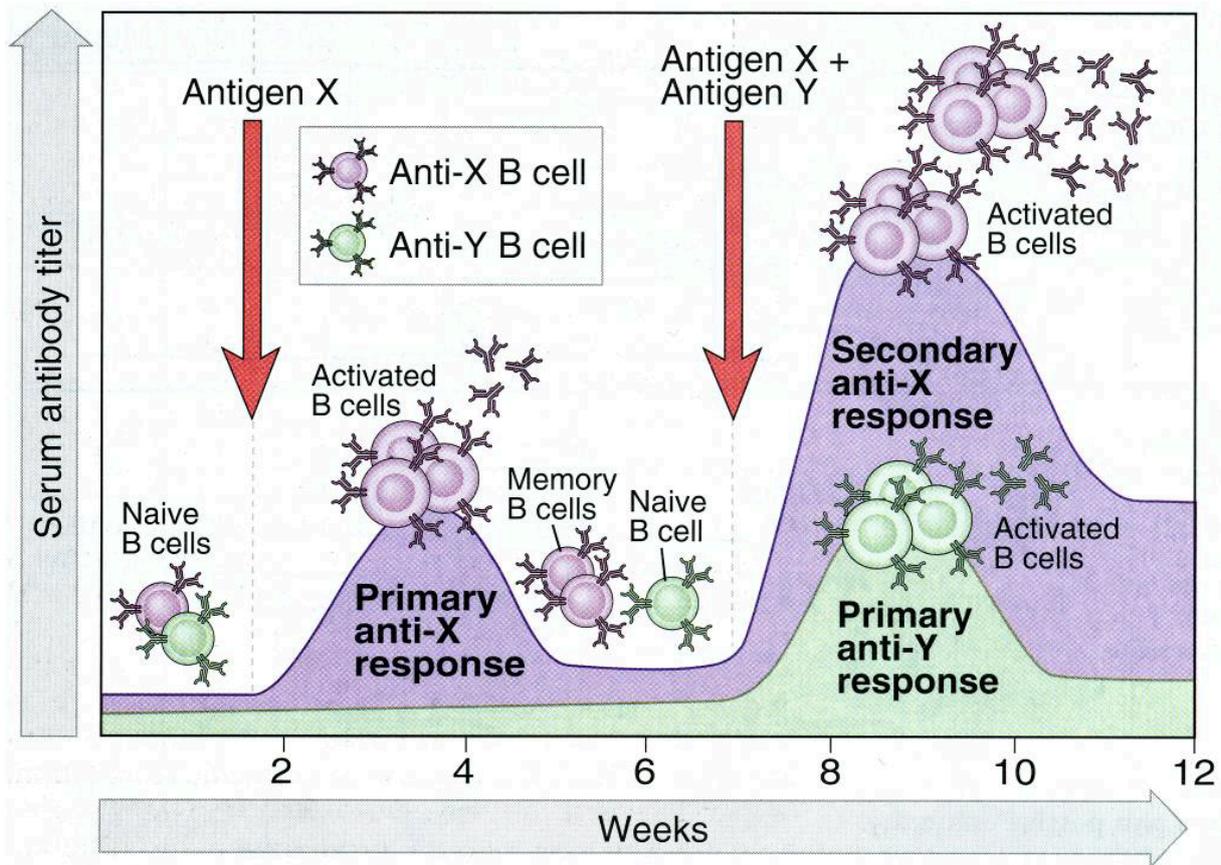


Figure 16 : Lymphocytes B mémoire et réponse lors d'une seconde infection par un pathogène (Abbas, 2003)

Les immunoglobulines produites vont se lier aux épitopes dont ils sont spécifiques s'ils sont accessibles à la surface de l'agent pathogène par exemple, au site d'infection ou de la vaccination, ce qui permet éventuellement la neutralisation. Les premiers isotypes à être sécrétés sont les IgM, suivies ensuite par les IgG. Il y a une augmentation du taux de ces anticorps, puis un plateau, avant une phase de contraction de la réponse. Lors d'un second contact avec l'antigène, les IgG sont produites directement et de façon beaucoup plus intense, pendant une plus longue durée. Les IgM quant à elles ne sont produites que de façon limitée dans cette situation. Après une seconde stimulation antigénique, la population de lymphocytes B mémoire est restaurée.

Les immunoglobulines peuvent avoir plusieurs fonctions dont les 3 premières sont celles mobilisées par la vaccination :

- La neutralisation, par formation de complexes immuns antigène-anticorps ensuite dégradés et éliminés
- L'initiation de la cascade du complément qui va permettre la lyse du pathogène suite à la fixation de la protéine C1 au complexe antigène-anticorps
- L'opsonisation, en particulier avec les IgG, qui permet une dégradation du pathogène par les macrophages
- La dégranulation des mastocytes et basophiles, mécanisme valable uniquement avec les IgE dans le contexte des allergies
- La cytotoxicité dépendante des anticorps, ou ADCC (pour Antibody Dependant Cell Cytotoxicity), surtout valable pour l'élimination des cellules infectées et des cellules tumorales

c. Méthodes d'évaluation de la réponse vaccinale

Dans le cadre du développement d'un vaccin, les deux paramètres sur lesquels repose l'évaluation sont l'innocuité et l'efficacité du vaccin. Un vaccin doit remplir plusieurs critères pour pouvoir être considéré comme efficace. Il doit être reconnu comme un danger par l'organisme, ce qui va activer la réponse immunitaire innée et donc créer une réaction inflammatoire. Il doit y résister de sorte à déclencher la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative spécifique et une mémoire vis-à-vis de cet agent pathogène.

En général, un vaccin protège des manifestations cliniques d'une ou plusieurs maladies, mais ne protège pas toujours contre l'infection, ou de façon partielle. Un animal vacciné peut donc être porteur sain, voire excréteur de l'agent.

La réponse humorale peut être évaluée en mesurant la concentration des IgG dans les fluides biologiques et en particulier le sang. Ce dosage peut être réalisé dans le sérum de la mère, dans le colostrum de la première traite, et ultérieurement dans le sérum du veau pour évaluer la qualité du transfert de l'immunité passive.

Dans le colostrum produit par une vache vaccinée, on retrouve des cytokines telles que l'interleukine 1 beta (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale beta (TNF- β) et l'interféron gamma (IFN γ) (Chase, Hurley and Reber, 2008). On y trouve également des leucocytes : macrophages, lymphocytes (95% de lymphocytes T, 5% de lymphocytes B) et des neutrophiles (Chase, Hurley and Reber, 2008). La production d'anticorps par les veaux peut être détectée à partir de 4 jours d'âge. On trouve fréquemment des IgM à partir de 8 à 10 jours de vie. Les IgG ne sont produites que plus tardivement (Smith, 2019). Ainsi, chez un veau présentant un défaut de transfert de l'immunité passive, qui n'a pas reçu de colostrum à la naissance ou en trop faible quantité, le taux d'IgG lors d'un dosage réalisé dans les premiers jours de vie sera anormalement faible.

La réponse cellulaire a jusque-là été très peu étudiée dans le cadre vaccinal chez les bovins. Elle peut être évaluée en dosant l'activité des cytokines dans le plasma maternel ou celui du veau, après stimulation antigénique. On recherche différentes cytokines, comme par exemple IL-1, IL-4, TNF- α ou IFN γ (Salmon et al., 2009).

Il existe parfois des échecs vaccinaux dont l'origine est quelquefois difficile à identifier et même si les conditions de la vaccination ont en apparence été respectées (calendrier d'administrations respecté, voie d'administration adaptée, conservation du produit conforme). Cet échec, lorsqu'il est suspecté par l'éleveur et le vétérinaire, doit faire l'objet d'un rapport de pharmacovigilance auprès de l'ANSES en précisant le nom du vaccin concerné, le numéro de lot, la date d'expiration. Cette déclaration, si elle n'est pas isolée, peut permettre d'identifier un lot défaillant par exemple, ce qui est rare à exceptionnel.

3) Vaccins et vaccination

Bien que le principe de la vaccination ait été décrit par Jenner en 1796 avec la vaccine des bovins et la variole de l'homme, c'est à Pasteur que l'on doit la mise au point du premier vaccin contre la rage en 1885 (Tizard, 2021). Un vaccin est un médicament qu'on peut définir comme un outil de prophylaxie dont le but est de stimuler le système immunitaire de façon spécifique avec un antigène, de sorte à créer une protection contre un agent pathogène avant que l'organisme ne le rencontre. Contrairement aux antibiotiques par exemple, les vaccins n'ont pas d'impact sur l'environnement. S'il y a un contact ultérieur avec l'agent concerné par la vaccination, la réponse immunitaire induite sera plus rapide et plus efficace. L'objectif est donc de permettre une protection de nature immunitaire, qui soit durable contre un agent pathogène, en faisant appel à la mémoire immunitaire. Pour cela, on mime l'infection en s'affranchissant des conséquences cliniques et lésionnelles. Elle doit être différenciée de la sérothérapie qui est un traitement d'urgence, qui repose sur le transfert d'une quantité connue d'anticorps et qui ne permet qu'une protection à court terme, qui disparaît une fois les anticorps éliminés.

La vaccination a non seulement un intérêt à l'échelle individuelle puisqu'elle protège l'individu ou l'animal vacciné, mais également à l'échelle collective, car plus la vaccination est répandue dans une population, plus le risque d'épidémie ou d'épizootie est réduit. En médecine humaine, cela permet ainsi la protection des individus ne pouvant pas eux-mêmes être vaccinés, qu'on regroupe sous le sigle YOPI. Il comprend les jeunes enfants (young), les personnes âgées (old), les femmes enceintes (pregnant) et les personnes immunodéprimées (immunocompromised).

a. Les différents types de vaccins

Pour le développement d'un vaccin, il est très utile de bien connaître l'agent pathogène contre lequel on souhaite protéger l'organisme. En effet, un pathogène intracellulaire nécessitera plutôt une réponse cellulaire, tandis que la protection vis-à-vis d'un pathogène qui agit en produisant des toxines sera meilleure par une réponse anticorps. De plus, certains pathogènes

sont en constante mutation (exemple du virus de la grippe chez l'homme), ce qui nécessite d'adapter le vaccin tous les ans.

Les premiers vaccins à avoir été développés sont des **vaccins vivants atténués**. Ils contiennent un agent qui a été atténué naturellement, ou en laboratoire. Pour cela, l'agent est multiplié dans des conditions non optimales de sorte à provoquer l'apparition de mutations qui sont associées à la réduction ou la disparition de son pouvoir pathogène. Les protéines de surface du pathogène atténué restent très similaires à celles du pathogène natif, d'où la très bonne réponse immunitaire induite, même à faible dose et avec un nombre limité d'administrations. Ils induisent souvent une réponse mixte, humorale et cellulaire, et prodiguent une protection de longue durée. La fabrication de ces vaccins est relativement simple puisqu'elle ne demande que la propagation en culture de l'agent ; c'est pourquoi leur coût est généralement assez faible. Il y a néanmoins un risque de réversion vers une forme pathogène, car l'agent est vivant et se réplique et on ne doit donc pas négliger le risque d'une maladie vaccinale, aussi faible soit-il, en particulier chez les individus immunodéprimés. Pour ce type de vaccin contenant des agents vivants, il est primordial de respecter la chaîne du froid pour empêcher l'inactivation.

Les **vaccins vivants délétés** utilisent le pathogène ciblé dans lequel des parties non essentielles du génome qui codaient pour les facteurs de virulence ont été retirées par délétion ou mutagenèse dirigée. Dans ce processus, il faut veiller à conserver les gènes qui codent pour les antigènes cibles. On obtient alors un vaccin relativement stable et il y a peu de risques de réversion. De plus, cette technique permet de réaliser des vaccins DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals), ce qui a un réel intérêt dans le cadre de certaines maladies réglementées. En effet, cela permet de créer une réponse immunitaire différente entre les animaux infectés et les animaux vaccinés, que la sérologie permet de discriminer. Dans un pays indemne d'une maladie en particulier, il est alors possible de vacciner les animaux sans risque de confusion avec l'infection naturelle et son statut peut alors perdurer.

Les **vaccins inactivés** sont constitués de micro-organismes qui ont été tués, mais dont les épitopes conformationnels ont été conservés. Pour cela, on leur fait subir un traitement chimique (en général avec du formaldéhyde) ou thermique (par chauffage) ou les deux.

L'avantage de l'inactivation du pathogène est de supprimer tout pouvoir pathogène et donc de prodiguer une plus grande sécurité d'utilisation. Cette technique permet également de rendre le produit plus stable ; il y a donc moins de contraintes pour la conservation. Cependant, les traitements chimiques ou thermiques peuvent modifier la structure des protéines de surface et faire varier l'antigénicité du vaccin. De plus les micro-organismes ayant été rendus inertes, il n'y a plus de réplication, ce qui altère très fortement l'immunogénicité de la préparation. Aussi, il est nécessaire d'ajouter un ou plusieurs adjuvants et le protocole vaccinal comporte très souvent plusieurs administrations, nécessaires pour obtenir une grande amplitude de la réponse. Ces vaccins induisent une réponse humorale de courte durée, d'où la nécessité de faire des rappels souvent annuels. Le risque peut résider dans la mauvaise inactivation du pathogène. Le coût de production est plus grand que celui des vaccins vivants atténués.

Dans les **vaccins sous-unitaires**, seule une fraction de l'agent pathogène est présente. Pour cela, on isole une ou plusieurs protéines d'intérêt, ou bien le ou les gènes codant pour des protéines immunogènes de l'agent pathogène. On les insère dans un système procaryote ou eucaryote qu'on isole ensuite. Il faut alors choisir un système facile à cultiver, dont la production est élevée et qui soit simple à isoler ou purifier. Dans le vaccin, on va uniquement incorporer des protéines qui ne sont plus dans leur environnement initial, ce qui peut créer des modifications de conformation. Il peut être nécessaire de trouver un système de production qui soit capable d'effectuer les étapes de maturations post-traductionnelles des protéines. Pour la purification, soit l'antigène cible reste dans la cellule où il a été produit et il faut donc la lyser pour le récupérer, soit il y a sécrétion de l'antigène ce qui permet de le récupérer après centrifugation. La réponse immunitaire induite uniquement par les protéines n'est pas suffisamment ample ou durable, il faut donc y associer des adjuvants. Les supports des systèmes de production peuvent prendre des formes très diverses : *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, baculovirus, des plantes ou animaux transgéniques. Des chercheurs travaillent par exemple sur la production de particules virales de rotavirus dans du lait de lapines dans le but de développer un vaccin contre les entérites à rotavirus chez les nouveau-nés humains (Soler et al., 2005).

On trouve d'autres types de vaccins plus récents :

Les **vaccins vivants recombinés réplikatifs** contiennent une bactérie ou un virus non pathogène dans lesquels on a intégré une partie du génome de l'agent pathogène ciblé. Pour ces derniers, on choisit un vecteur reconnu comme non pathogène, dans lequel il est facile d'insérer des gènes et qui est simple à cultiver. Ce vecteur doit exprimer suffisamment les protéines auxquelles on souhaite recourir et être stable génétiquement. Ces vaccins sont très stables : ils sont utilisés sous forme d'appâts lyophilisés pour vacciner la faune sauvage contre la rage. Cette technique est également sécuritaire car elle ne nécessite pas de manipuler des agents pathogènes potentiellement dangereux puisque seule une fraction de l'agent est présente. Elle permet aussi de produire des vaccins contre des agents pathogènes que l'on ne parvient pas à cultiver. Toutefois, il faut toujours rester vigilant car les vecteurs utilisés peuvent avoir un pouvoir pathogène résiduel et certains peuvent se répliquer chez l'hôte vacciné. Cette technique permet également d'obtenir des vaccins DIVA.

Les **vaccins vivants recombinés non réplikatifs** sont fabriqués selon le même principe mais ils utilisent des vecteurs qui peuvent infecter sans se multiplier chez l'espèce cible. On utilise par exemple un poxvirus comme le canarypox (virus aviaire) dans un vaccin contre la leucose féline (PUREVAX®, Boehringer Ingelheim) ou encore dans un vaccin contre l'influenza chez les chevaux (PROTEQFLU®, Boehringer Ingelheim). L'immunogénicité est faible pour ce type de vaccin car il n'y a pas d'amplification ; il faut donc des rappels fréquents.

Les **vaccins à ADN** utilisent un plasmide dans lequel le morceau d'ADN d'intérêt avec un promoteur fort a été intégré. Ils permettent généralement une expression forte de l'antigène cible. On injecte ce plasmide par voie intramusculaire ou intradermique ; c'est l'organisme vacciné qui va exprimer l'antigène directement. La réponse immunitaire obtenue est très satisfaisante avec une efficacité proche de celle des vaccins vivants, tout en ayant un produit stable. Ce système n'utilise pas d'organisme vivant, donc c'est une technique à faible risque pour l'organisme vacciné. De plus, l'ADN plasmidique agit comme un adjuvant car, contrairement aux systèmes eucaryotes, les doublets CpG ne sont pas méthylés chez les bactéries, ce qui stimule d'autant plus le système immunitaire.

Un résumé schématique des différents types de vaccins existants est présenté en **figure 17**.

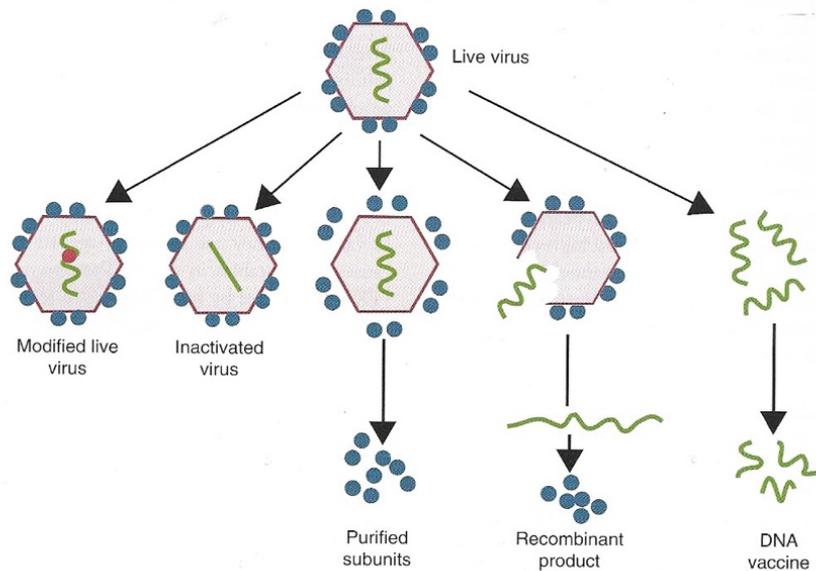


Figure 17 : Différentes méthodes de traitement des virus pour produire un vaccin (Tizard, 2013)

b. Les adjuvants : nature, activité

L'immunogénicité induite par les divers types de vaccins n'est pas toujours suffisante. Il est donc nécessaire d'ajouter des substances qui stimulent une réponse immunitaire plus forte, désignés sous le nom d'adjuvants. Ils favorisent l'inflammation et permettent de mimer une infection naturelle. Ils sont utilisés dans les vaccins tués ou sous-unitaires et améliorent également la qualité de la réponse humorale (**Figure 18**) en orientant la réponse immunitaire en fonction de l'agent pathogène qui est ciblé. Ils ne doivent cependant pas affecter l'innocuité du vaccin. Selon l'adjuvant utilisé, les lymphocytes T auxiliaires (LT CD4) activés seront plutôt de type 1 ou 2. Cela dirige la réponse plutôt du côté de la production d'anticorps ou vers une réponse plus mixte incluant la réponse cellulaire. Ainsi, pour sélectionner un adjuvant, il faut considérer l'antigène utilisé dans la préparation vaccinale, le type de réponse immunitaire visé, la voie d'administration du vaccin et l'espèce à vacciner (certains adjuvants ne sont pas tolérés chez l'homme par exemple).

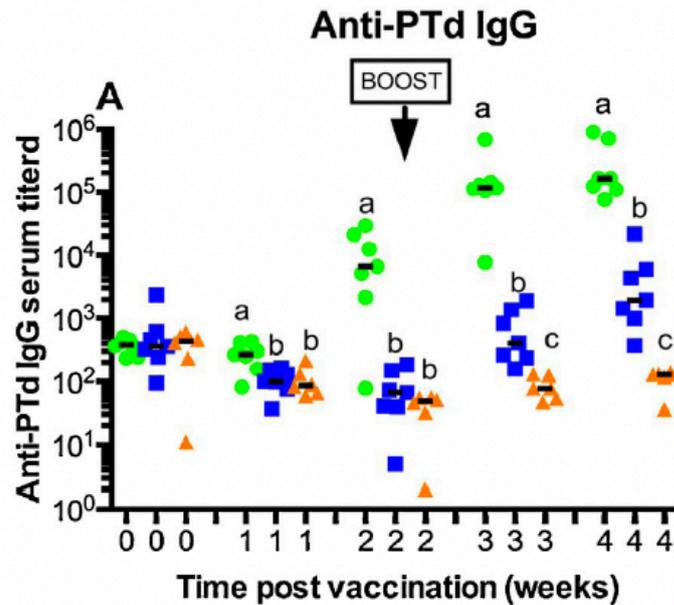


Figure 18 : Réponse immunitaire induite par un vaccin DTaP (diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche) avec ou sans adjuvant (modèle porcine) (Polewicz et al., 2013)

Dans cette étude (**Figure 18**), les porcelets sont nés de mères non vaccinées. Ils ont été vaccinés à 3 jours d'âge puis ont reçu une deuxième injection 2 semaines plus tard.

En vert : Vaccin avec nouvel adjuvant (cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide CpG + cationic innate defense regulator peptide IDR + polyphosphazène)

En bleu : vaccin commercialisé : Quadracel® (Adjuvant : phosphate d'aluminium)

En orange : Phosphate Buffered Saline (PBS, solution saline tamponnée au phosphate = placebo)

En utilisant un adjuvant, on peut réduire la durée du protocole vaccinal, le nombre d'injections nécessaires pour atteindre un certain niveau de réponse, ainsi que la dose d'antigène utilisée (**Figure 19**).

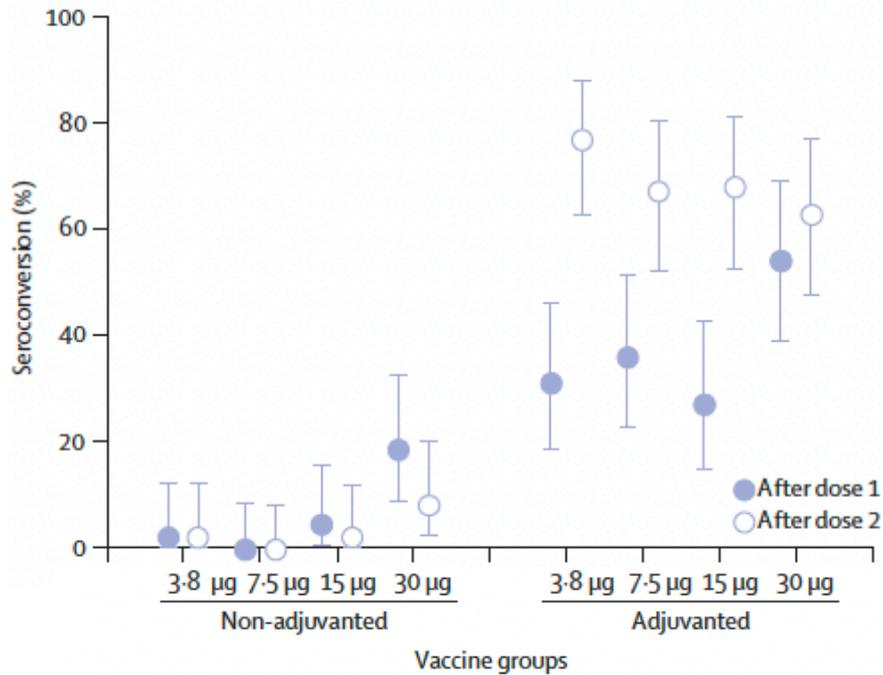


Figure 19 : Séroconversion induite en fonction de la quantité d'antigène dans un vaccin influenza aviaire H5N1, avec ou sans adjuvant (modèle humain) (Leroux-Roels et al., 2007)

Dans cette étude, le protocole consistait en 2 injections par voie intramusculaire à 21 jours d'intervalle. L'adjuvant utilisé était une émulsion huile dans eau (phase huileuse : DL- α -tocophérol et squalène).

Les adjuvants doivent avoir deux propriétés :

- Immunostimulants : ils ont une action sur la réponse immunitaire innée en favorisant le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigène (CPA).
- Supports micro-particulaires : ils jouent un rôle dans la biodisponibilité de l'antigène et facilitent sa capture par les cellules dendritiques.

Les sels d'aluminium sont les adjuvants les plus anciens et les plus couramment utilisés. Ce sont des cristaux auxquels l'antigène vaccinal est lié. Les cellules phagocytaires de la réponse immunitaire innée doivent donc phagocyter les cristaux minéraux de sorte à avoir accès à l'antigène. La réaction inflammatoire induite est forte avec un recrutement cellulaire intense

et l'antigène est dégradé plus lentement. Ce type d'adjuvant induit une réponse immunitaire anticorps de bonne intensité.

Les saponines sont également utilisées en médecine vétérinaire. Ce sont des substances végétales, tensioactives et amphiphiles. Elles orientent vers une réponse immunitaire plutôt de type 1, et promeuvent donc une réponse cellulaire. Leur mécanisme d'action précis n'est pas connu. On peut les utiliser dans la préparation de structures vésiculaires appelées ImmunoStimulating COMplexes (ISCOMs), dans lesquelles l'antigène est enchâssé (Vermout et al., 2003). On peut les combiner avec des sels d'aluminium dans le but d'induire une réponse mixte anticorps et cellulaire.

D'autres composants peuvent être utilisés pour former des adjuvants vésiculaires tels que les liposomes ou des enveloppes virales reconstituées. L'antigène est inséré soit à l'intérieur de la vésicule, soit dans sa membrane, soit il est adsorbé à la surface (Vermout et al., 2003).

On trouve dans certains vaccins des adjuvants à base d'huile. Ils ne sont pas utilisés en médecine humaine car ils créent des réactions locales trop marquées (Sinno-Tellier, Jegou and Pineau, 2020). Ces adjuvants se présentent sous forme d'émulsions « eau dans huile » ou au contraire « huile dans eau ». On a donc deux phases stabilisées par des tensioactifs alors qu'elles sont en théorie non miscibles (Charreyre and Audonnet, 2017). Cela permet de libérer l'antigène de façon progressive. En expérimentation animale, on utilise par exemple l'Adjuvant Incomplet de Freund (AIF) qui est une émulsion d'huile de paraffine avec de l'Arlacel A (*mannide monooleate*). L'AIF est un composant de l'Adjuvant Complet de Freund (ACF), auquel est associé une mycobactérie inactivée par la chaleur, *Mycobacterium tuberculosis*. L'ACF induit une réponse humorale, grâce à l'émulsion eau dans huile, et cellulaire, *via* l'effet des mycobactéries. L'AIF et l'ACF présentent une toxicité trop importante pour obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM). En effet, de nombreuses lésions telles que des abcès ou granulomes ont pu être observés suite à l'administration d'ACF et les huiles minérales telles que la paraffine ont été reconnues comme cancérigènes (Vermout et al., 2003). Le squalène est une huile non toxique utilisée dans certains adjuvants de vaccins commerciaux. Dans les préparations « huile dans eau », on peut ajouter des copolymères synthétiques amphiphiles. Ils servent à placer l'antigène à la surface des gouttelettes huileuses

(Vermout et al., 2003). Sur le même principe, des amines lipophiles sont utilisées car elles permettent la formation de micelles dans une solution aqueuse. Dans les adjuvants « huile dans eau », la phase aqueuse étant dominante, ces préparations se dispersent rapidement dans l'organisme ce qui limite le risque de lésions dues à l'administration, contrairement aux émulsions « eau dans huile » où la phase huileuse peut stagner.

Dans certains vaccins administrés par voie transmuqueuse, des formes mutées de toxines telles que la toxine cholérique de *Vibrio cholerae*, la toxine pertussique de *Bordetella pertussis* ou encore la lymphotoxine thermolabile de *Escherichia coli* sont utilisées. Les mutations qu'elles ont subi permettent leur innocuité ; elles aident à la stimulation du système immunitaire, en orientant la réponse vers le type 2 (Vermout et al., 2003).

Les cytokines sont des effecteurs de la réponse immunitaire qui peuvent être ajoutées à des préparations vaccinales pour stimuler cette dernière. Selon la ou les cytokines choisies, le profil de la réponse induite ne sera pas le même.

Les imidazoquinolones ont une action sur les récepteurs membranaires des macrophages notamment, ce qui module la synthèse de cytokines et oriente la réponse immunitaire vers le type 1.

Les polysaccharides sont eux des adjuvants intéressants dans des vaccins dont l'administration se fait par voie transmuqueuse.

L'utilisation de plusieurs adjuvants en association peut permettre de mutualiser leurs effets. Par conséquent, la réponse immunitaire peut être dirigée vers un type préférentiel en fonction de l'agent pathogène visé.

c. Vaccination et mécanismes de protection attendus

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte dans le développement de la réponse immunitaire à la suite de la vaccination :

- L'immunogénicité de l'antigène utilisé : selon sa nature, un antigène peut être plus ou moins immunogène et la nature de la réponse développée plus ou moins propice à son élimination
- La présentation physique de l'antigène : si la dose est trop grande par exemple ou que la reconnaissance se fait dans un contexte inadapté, un phénomène de tolérance vis-à-vis de l'antigène au sens large peut apparaître
- La voie d'administration du vaccin : l'établissement de réponses locales incite à développer des vaccins dont l'administration se fait par la voie d'entrée des pathogènes concernés (par exemple la voie intranasale)
- La présence ou non d'adjuvants : elle dépend de l'antigène que l'on utilise dans le vaccin ; en fonction de sa nature, il n'est pas toujours nécessaire d'augmenter l'immunogénicité de l'antigène présent.
- Le nombre d'administrations : cela ne peut pas être déterminé *a priori*, il faut, durant la phase de développement, faire des évaluations pour voir combien sont nécessaires

La réponse immunitaire peut prendre différentes formes qui sont plus ou moins aptes à éliminer l'agent infectieux :

- Réponse de type cellulaire en lien avec la production d'interféron-gamma (IFN γ) dans le cas de pathogènes intracellulaires (virus)
- Réponse vaccinale fondée sur les anticorps dans le cas de pathogènes extracellulaires

Si la réponse induite est mixte, la production d'anticorps dirigés contre le pathogène d'intérêt, permettant sa neutralisation, et la production de cellules cytotoxiques qui vont détruire les cellules infectées, sont induites. Si en revanche, la réponse est très préférentiellement une réponse anticorps, la neutralisation de l'agent pathogène ou le blocage de certaines fonctions (comme l'adhésion aux cellules de l'hôte) favorise la phagocytose par opsonisation. Les anticorps peuvent également aider à la neutralisation des toxines produites par les bactéries.

Par la vaccination, il est possible d'induire une mémoire immunitaire qui va permettre de protéger l'animal s'il rencontre de nouveau le pathogène ciblé. En effet, lors d'une première rencontre avec un pathogène, le système immunitaire met 2 à 3 semaines pour produire une réponse efficace pour l'éliminer. En revanche, lors d'un second contact, cette réponse est

efficace en quelques jours seulement car les effecteurs déjà présents ne sont plus naïfs face à ce pathogène et ont une capacité de réponse augmentée. Cette mémoire peut être plus ou moins durable. Elle peut être améliorée grâce aux adjuvants.

II. Partie 2 : étude expérimentale

1) Contexte et motivations de l'étude

Cette étude a pour but d'analyser le type et l'efficacité de la réponse immunitaire induite lors d'une vaccination contre les entérites néonatales chez des vaches laitières, en fonction de deux vaccins qui diffèrent par l'adjuvant utilisé.

Dans un contexte de limitation de l'usage des antibiotiques, la vaccination est une méthode de prévention primordiale à mettre en place, notamment parce qu'elle permet de réduire l'incidence clinique de nombreuses maladies. Elle rend possible la diminution des traitements tels que les antibiotiques et ainsi le risque de sélection de bactéries résistantes qui est lié à leur utilisation.

Les entérites néonatales des veaux ont un impact économique très important pour les éleveurs : mortalité, coûts des traitements, croissance réduite. L'utilisation des vaccins représente un coût non négligeable, mais lorsqu'un protocole est correctement mis en place, associé à une bonne gestion sanitaire de l'élevage, le gain de temps et le bénéfice financier sont parfois considérables.

Le bien-être animal peut également être amélioré par la vaccination. En effet, les entérites néonatales sont des causes de détérioration rapide de l'état clinique des jeunes veaux et peuvent avoir des répercussions majeures sur leur croissance, voire provoquer leur mort. Or, la vaccination, même si elle ne garantit pas une protection totale contre les principaux agents pathogènes responsables de ces affections, permet toutefois de réduire la fréquence et les symptômes des entérites, à la fois leur intensité et leur durée, avec une amélioration du bien-être animal.

2) Matériel et méthodes

a. Animaux

Les animaux ont été sélectionnés dans un élevage de vaches laitières de race Prim'Holstein situé en Espagne, en Catalogne, au nord de Gérone. Pour limiter au maximum l'implication de facteurs extérieurs dans le développement de la réponse immunitaire, la ration des vaches ainsi que leur supplémentation en vitamines et oligo-éléments a été contrôlée. Dans cet élevage, toutes les vaches sont vaccinées contre les ENN avant la mise-bas avec BOVIGEN SCOUR®.

Pour avoir des animaux de même parité et les plus naïfs possible par rapport au rotavirus, au coronavirus et à *E. coli* F5, un choix sur la base de résultats sérologiques a été effectué au sein du groupe des génisses gravides avec une date de mise bas comprise entre mars et juillet 2022. Elles n'avaient jamais été vaccinées contre les ENN, contrairement aux vaches multipares du même élevage.

Une analyse sérologique a donc été réalisée avant l'inclusion. Pour cela, des prélèvements de sang sur tube sec ont été effectués sur 179 génisses confirmées gravides de sorte à doser les anticorps sériques spécifiques de *E. coli* F5, des rotavirus et coronavirus. Ces analyses ont été réalisées à l'aide de kits commercialisés par Bio-X Diagnostics.

Les sérologies pour le coronavirus étaient rarement négatives, avec des titres en anticorps parfois même très élevés. Ce critère n'a donc pas été conservé pour le choix des animaux. Quarante-huit vaches ayant des taux d'anticorps vis-à-vis du rotavirus et de l'antigène F5 d'*E. coli* les plus faibles possibles ont été retenues pour former de façon randomisée 4 groupes de 12 animaux :

- Un groupe témoin non vacciné (CTL)
- Un groupe vacciné avec BOVIGEN SCOUR® (BS)
- Un groupe vacciné avec BOVILIS ROTAVEC CORONA® (RC)
- Un autre groupe vacciné avec BOVIGEN SCOUR® et recevant au moment de la vaccination une injection de MULTIMIN™ fait l'objet d'une autre étude (BS_MN)

Cinq vaches ont été exclues de l'étude : trois d'entre elles avaient déjà été vaccinées par erreur avant le début du protocole et deux autres sont mortes entre la date d'inclusion et de constitution des groupes, et la date de réalisation des injections vaccinales.

Un volet d'étude sur les veaux a également été inclus dans cette étude, afin de suivre la transmission de l'immunité cellulaire de la mère au veau. Pour cela, dix veaux ont été recrutés, nés de neuf mères primipares vaccinées avec BOVIGEN SCOUR® dans les mêmes conditions que celles décrites plus haut. Ils ont été séparés de leur mère dès la naissance et placés dans des box individuels grillagés avec contact visuel possible avec leurs voisins. Ces box étaient préparés au moment de la mise-bas avec une litière de copeaux propres. Les nouveau-nés ont reçu 2,5 à 3 litres de colostrum de leur mère dans les heures suivant la naissance, par sondage œsophagien.

b. Description des vaccins utilisés et leur AMM

Il s'agit de l'étude comparative de la réponse immunitaire produite par deux vaccins commerciaux utilisés dans le cadre de la prévention des entérites provoquées par *E. coli* F5, rotavirus et coronavirus chez le veau.

Dans cette étude, deux vaccins multivalents ont été utilisés. Ils servent à l'immunisation des vaches gravides, de sorte à produire des anticorps contre les antigènes de l'adhésine F5 d'*E. coli*, les rotavirus et les coronavirus. Leurs principales caractéristiques sont présentées dans le **tableau 5**.

On peut constater que les valences vaccinales sont identiques dans les deux vaccins, même si l'identité des souches utilisées est différente. La différence majeure réside dans la nature des adjuvants utilisés. L'adjuvant contenu dans le vaccin BOVIGEN SCOUR® est une émulsion « eau dans huile dans eau » et l'huile utilisée est minérale. Dans BOVILIS ROTAVEC CORONA®, l'hydroxyde d'aluminium est l'adjuvant principal, mais un autre adjuvant dont la nature n'est pas détaillée, une huile sans autre précision sur sa nature, est également présent.

Tableau 5 : Caractéristiques des vaccins utilisés dans l'étude

Nom déposé (laboratoire)	Valences utilisées			Adjuvant(s)	Dose	Voie d'administration	Protocole recommandé
	Rotavirus	Coronavirus	<i>E.coli</i>				
BOVIGEN SCOUR® (Virbac)	Souche TM- 91, sérotype G6P[1]	Souche C-197	Souche EC/17 exprimant l'adhésine F5 (K99)	Montanide™ ISA 206 VG	3 mL	IM	Une dose entre la 12 ^e et la 3 ^e semaine avant mise- bas
BOVILIS ROTAVEC CORONA® (MSD Santé Animale)	Souche UK- Compton, sérotipe G6P[5]	Souche Mebus	Adhésine <i>E.coli</i> F5 (K99)	- Huile minérale légère (émulsifiant) - Hydroxyde d'aluminium	2 mL	IM	Une dose entre la 12 ^e et la 3 ^e semaine avant mise- bas

Le protocole de cette étude a consisté en une administration de l'un ou l'autre de ces vaccins, entre 6 et 13 semaines avant la date prévue du terme, en suivant les recommandations données dans les RCP de ces vaccins (**Tableau 5**).

c. Échantillons

i. Nature des échantillons

Divers échantillons ont été collectés. Ils sont présentés dans le **tableau 6**. La chronologie des prélèvements est présentée en **Annexe 5**.

Tableau 6 : Échantillons prélevés au cours de l'étude

Population prélevée	Date de prélèvement	Analyse réalisée	Nature de l'échantillon	Mode de prélèvement
Vaches	6 semaines avant vêlage, avant vaccination (J0)	Dosage des oligo-éléments (Cu, Zn, Se)	Plasma	Tube S-Monovette® héparine de sodium 7,5 mL
		Dosage des anticorps spécifiques	Sérum	Tube sec 5 mL
		Dosage de l'activité cellulaire	Plasma	4 tubes S-Monovette® héparine de lithium 1,2 mL
	J0+28 jours	Dosage des anticorps spécifiques	Sérum	Tube sec 5 mL
		Test de séroneutralisation du rotavirus	Sérum	Tube sec avec gel 10 mL
		Dosage de l'activité cellulaire	Plasma	4 tubes S-Monovette® héparine de lithium 1,2 mL
	Vêlage	Dosage des anticorps spécifiques	Colostrum	Flacon de prélèvement 150 mL
	Veaux	Vêlage + 24-36 heures	Dosage des anticorps spécifiques, γ -GT, IgG totales	Sérum
Dosage de l'activité cellulaire			Plasma	4 tubes S-Monovette® héparine de lithium 1,2 mL

Tous les échantillons sanguins ont été prélevés à la veine jugulaire des animaux. Pour cela, un montage composé d'une aiguille 20G, d'une tubulure, d'un robinet 3 voies et d'une seringue de 10 mL a été utilisé. Ce montage était préalablement hépariné pour éviter la coagulation rapide du sang, le temps de prélèvement pouvant être long, puisque de nombreux tubes devaient être collectés. Sur le robinet 3 voies était également branché un adaptateur permettant de connecter les tubes S-Monovette®.

Les prélèvements sanguins ont été effectués à l'aide de la seringue, puis, une fois remplie, le robinet 3 voies était orienté de sorte à faire circuler le sang de la seringue vers l'adaptateur monovette sur lequel étaient connectés les divers tubes S-Monovette®. Pour les veaux, ce montage n'était pas utilisé. Un adaptateur était branché sur une aiguille 20G et les tubes S-Monovette® étaient directement connectés. Les tubes secs ont été remplis à l'aide de corps de prélèvements sur lesquels étaient montées des aiguilles 20G.

Les prélèvements de colostrum ont été réalisés par les techniciens de l'élevage juste après la mise-bas. Ils ont été placés à -20°C en attendant d'être collectés, puis analysés.

L'identification a été réalisée à la main en indiquant le numéro de travail de l'animal concerné sur chacun des échantillons.

Un dosage des principaux oligo-éléments (cuivre, zinc et sélénium) a été réalisé afin de connaître le statut des animaux pour ces éléments. Cette analyse a été en particulier utilisée dans une autre partie de l'étude qui se focalise sur l'intérêt de l'apport de MULTIMIN™ dans le développement de la réponse immunitaire.

Le dosage des anticorps spécifiques de BRV et BCoV a été réalisé avant et après vaccination chez les vaches vaccinées. En effet, le but est d'observer le degré de séroconversion à la suite de l'administration des vaccins et d'évaluer l'ampleur de celle-ci.

Les quatre tubes S-Monovette® héparine de lithium 1,2 mL utilisés pour le dosage de l'activité cellulaire, autrement dit de la réponse cytokinique, contenaient chacun un milieu différent. Ils étaient systématiquement remplis dans le même ordre :

1. Témoin, milieu seul
2. Peptides synthétiques de la protéine VP7 [G6] du BRV
3. Peptides synthétiques de la protéine S (spike) du BCoV
4. Concanavaleine A (ConA)

Chez les veaux, le dosage des γ -GT et des IgG totales a pour objectif d'évaluer la qualité du transfert colostrale de l'immunité anticorps, pour les corrélés avec le résultat de l'analyse cellulaire.

ii. Préparation et conditionnement

Les échantillons contenus dans les tubes secs 5 et 10 mL et les tubes S-Monovette[®] héparine de sodium 7,5 mL ont été conservés à température ambiante lors du transport de l'élevage au laboratoire puis placés à 4°C pendant 24 heures. Les tubes S-Monovette[®] héparine de lithium 1,2 mL ont été placés dans un incubateur à 38,5°C directement après le prélèvement et pendant une durée d'incubation de 24 heures. Cette incubation permet la stimulation des lymphocytes T avec les ligands, qui sont soit des peptides chevauchants correspondant à des antigènes dominants des BCoV et BRV, soit la ConA.

A l'issue de l'incubation, les échantillons de sang ont été conditionnés. Pour cela, ils ont d'abord été centrifugés pendant 20 minutes à 4°C à une vitesse de 2500 tours/minute. Le conditionnement de chacun des échantillons est détaillé dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Conditionnement des échantillons de l'étude

Échantillon	Volume prélevé	Outil utilisé	Conditionnement
Tube sec 5 mL : sérum	1 mL	Micropipette p 1000	Plaque 96 puits
Tube sec 10 mL : sérum	2 mL	Pipette Pasteur	Tube à hémolyse 5 mL
Tube S-Monovette [®] héparine de sodium 7,5 mL : plasma	2 x 1 mL /	Pipette Pasteur /	Microtubes 1,5 mL Culot du tube
Tubes S-Monovette [®] héparine de lithium 1,2 mL : plasma	2 x 600 μ L	Micropipette p 1000	Plaque 96 puits

iii. Conservation et transport des prélèvements

Le transport des échantillons a été réalisé dans les heures suivant les prélèvements à l'aide d'un véhicule de l'ENVT. Les tubes S-Monovette® héparine de lithium 1,2 mL étaient placés dans un incubateur Stuart SBH130D/3 branché sur la batterie du véhicule. Cet appareil maintenait les tubes à la température corporelle des bovins, soit 38,5°C. Les tubes S-Monovette® héparine de sodium 7,5 mL ainsi que les tubes secs 5 et 10 mL ont été transportés dans des porte-tubes à température ambiante. Les échantillons de colostrum, congelés, ont été transportés dans une glacière. La durée du transport était d'environ 3 heures.

Après conditionnement sur la base de plan de plaques recensant les échantillons et vérification de leur identification, tous les échantillons ont été conservés à -80°C dans les congélateurs du laboratoire de l'ENVT jusqu'à analyse.

d. Méthodes analytiques

La plupart des analyses ont été réalisées à l'ENVT. Le dosage de l'activité de la glutathion peroxydase permettant d'évaluer le taux de sélénium, ainsi que le test de séroneutralisation du rotavirus, ont été réalisés en sous-traitance.

Le dosage des anticorps spécifiques a été réalisé par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), une méthode classique de détection des anticorps dans le sérum.

La réponse cellulaire est évaluée en dosant un panel de 15 cytokines : 5 cytokines de la réponse innée, 5 cytokines de la réponse adaptative et 5 chimiokines. Selon l'intensité de leur expression, on peut caractériser la réponse immunitaire induite. Pour cela, un kit Milliplex® (Merck Millipore) sur mesure a été utilisé afin de réaliser un test multiplexe à l'aide du système Luminex xMap. Cette technique combine un ELISA multiplexe à la cytométrie en flux. Elle utilise des billes de polystyrène couvertes d'anticorps spécifiques à une protéine d'intérêt. Il est possible de tester plusieurs analytes en même temps, car les billes sont marquées avec

des fluorochromes différents correspondant à chaque protéine testée. Le système utilise ensuite la cytométrie en flux avec deux lasers pour identifier et quantifier les billes en fonction de leur fluorescence (**Figure 20**). Un laser rouge permet d'identifier la bille tandis qu'un laser vert permet la quantification en mettant en évidence les marqueurs fluorescents (par exemple la phycoérythrine) qui se sont liés aux protéines d'intérêt. Cela permet ainsi d'obtenir des résultats concernant plusieurs analytes en même temps, contrairement à un ELISA classique.

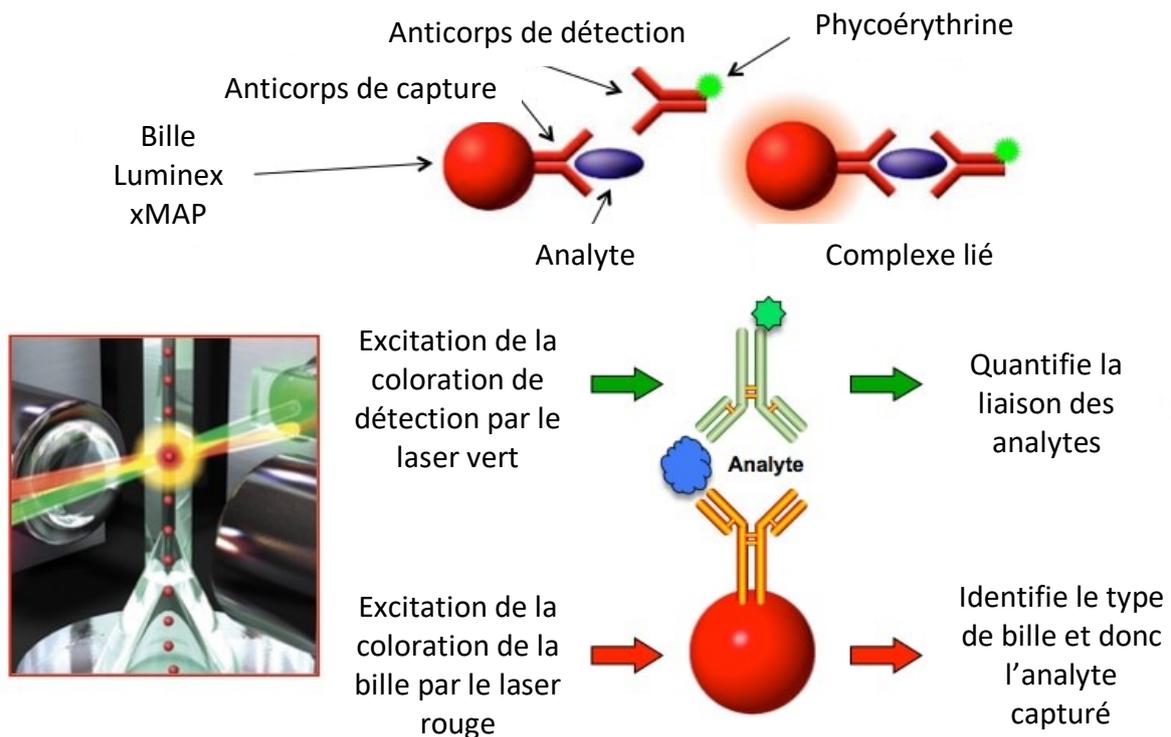


Figure 20 : Principe de fonctionnement du système Luminex xMAP (Source : <https://hhd.psu.edu/bbh/outreach-service/biomarker-core-laboratory/bcl-services/biomarker-testing/luminex-xmap-platforms>)

Les résultats ont été obtenus en valeurs relatives (Mean Fluorescence Intensity, MFI) ou en concentrations absolues (pg/mL). Les antigènes de rotavirus et coronavirus utilisés lors de la phase de stimulation sont les mêmes que les antigènes présents dans les vaccins, afin d'évaluer la réaction qui leur est commune.

e. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Student. Il permet de déterminer s'il existe des différences significatives entre des échantillons appariés. Le risque choisi est établi à 5%.

Les résultats ont également été exploités avec une analyse discriminante par les moindres carrés partiels, ou PLSDA (pour Partial Least Square Discriminant Analysis). Pour ceux-ci, les résultats n'ont pas été utilisés bruts mais après transformation : la valeur de la condition témoin a été soustraite aux résultats des mesures des autres conditions à J28. Cette méthode statistique permet la sélection de variables discriminatives (Lee, Liong and Jemain, 2018). On choisit cette méthode car il y a beaucoup de variables explicatives dans cette étude et on cherche à connaître leur importance individuelle (Addinsoft, n.d.). L'interprétation des résultats obtenus se fait à partir de graphiques qui montrent le poids de chacune des variables étudiées. On peut ainsi estimer la force du lien entre les différentes variables.

3) Résultats

a. Statut des vaches avant vaccination

i. Analyse sérologique pour la constitution des groupes

Les analyses sérologiques ont d'abord été réalisées vis-à-vis de BRV. Les vaches sélectionnées pour l'étude devaient avoir un titre en anticorps le plus faible possible, et donc inférieur au seuil d'inhibition donné par le fabricant, dont la valeur donnée est de 20% (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Taux de positivité des échantillons en fonction du pourcentage d'inhibition
(Source : Bio-X Diagnostics)

Valeur calculée	Niveau de positivité
% inhibition < 20	0
$20 \leq \% \text{ inh} < 40$	+
$40 \leq \% \text{ inh} < 60$	++
$60 \leq \% \text{ inh} < 80$	+++
$80 \geq \% \text{ inh}$	++++

Cependant, en prenant cette valeur, le nombre de vaches incluses dans l'étude n'était pas suffisant. Il a alors été décidé de relever ce seuil à 25%, ce qui a permis d'inclure les 48 vaches souhaitées dans le protocole. Les statuts sérologiques vis-à-vis d'*E. coli* et BCoV n'ont pas été pris en compte pour l'inclusion mais étudiés pour vérifier l'homogénéité entre les groupes. Pour *E. coli*, le statut sérologique interprété de toutes les vaches était négatif (seuil d'inhibition systématiquement < 20%), tandis que pour BCoV, le statut était très variable, allant de négatif à très positif (valeur d'inhibition allant jusqu'à 100%) (**Annexe 6**).

ii. Réponse anticorps avant la vaccination

Le délai entre la constitution des groupes, à la suite de la première analyse sérologique, et le début des prélèvements de l'étude a été d'environ 2 mois, en période hivernale, saison propice à la circulation de BRV et BCoV. Ainsi, le statut des vaches vis-à-vis de ces agents pathogènes a pu changer pendant cette période. Le statut sérologique des vaches a donc été réévalué avant leur vaccination (J0).

On constate que pour BRV, les pourcentages d'inhibition sont très variables (**Figure 21**). Le statut sérologique des vaches de l'étude pour cet agent, négatif au moment du recrutement des animaux, va de négatif à très positif à J0. Pour BCoV, le statut sérologique des vaches est pour la majorité d'entre elle très positif, selon les indications du fabricant, avec des pourcentages d'inhibition en grande partie supérieurs à 80%. La différence avec les résultats obtenus lors de la constitution de la cohorte pourrait être expliquée par une variabilité du test, non connue. Les groupes semblent moins homogènes que lors de leur constitution.

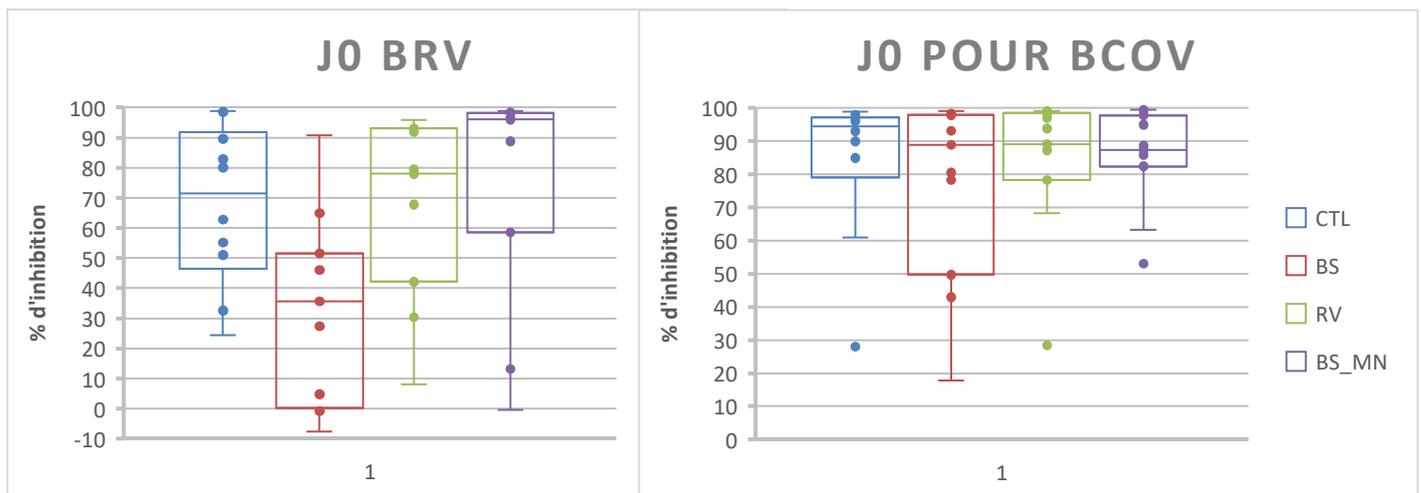


Figure 21 : Analyses sérologiques à J0 vis-à-vis de BRV et BCoV

iii. Réponse cellulaire avant la vaccination

La réponse cellulaire a été évaluée une première fois avant la vaccination afin de connaître le niveau de base chez les animaux et de pouvoir ensuite le comparer aux valeurs après la vaccination. Nous nous sommes d'abord intéressés aux résultats bruts de toutes les vaches incluses dans l'étude : cela permet d'évaluer chacune des cytokines testées en réponse à la stimulation avec les différents ligands utilisés (**Tableau 9**). En effet, le ligand coronavirus augmente significativement la sécrétion d'IFN γ , de CXCL10, d'IL-17A, d'IL-1RA, de CCL2, CCL3 et CCL4, avec une tendance pour IL-8. Au contraire, le ligand rotavirus augmente uniquement la sécrétion de CCL2, avec une tendance pour CCL4 (**Tableau 9**). Ceci concorde avec les conditions de sélection des animaux choisies pour cette étude : ils sont supposés naïfs vis-à-vis de BRV ou avec une réponse ancienne et peu active puisque le titre anticorps est faible, à l'inverse du BCoV. La condition témoin d'activation contient de la concanavaleine A (ConA). C'est un activateur polyclonal qui stimule les lymphocytes T et révèle le profil des LT CD4 et LT CD8 présents dans l'échantillon de sang. Il constitue donc le témoin positif, d'où l'augmentation significative de la sécrétion de toutes les cytokines présentées ici. Six des quinze cytokines testées ont été exclues pour cette analyse factorielle multiple de sorte à se focaliser sur celles qui étaient effectivement augmentées.

Tableau 9 : Effet des ligands sur la réponse cellulaire (Temps J0)

J0	Rotavirus	Coronavirus	ConA
IFN γ		***	***
CXCL10		**	***
IL8		0,079	**
IL17a		***	***
IL1b			**
IL1RA		*	*
CCL2	**	**	*
CCL3		**	***
CCL4	0,069	**	***

L'analyse intégrative des données permet de constater que les réponses des vaches aux conditions témoins sont très variables. En effet, on observe une distribution très étalée des résultats avec le ligand ConA (**Figure 22**). Même pour la condition témoin sans ligand, pour lequel on évalue l'activité de base de la cytokine, on a des résultats assez disparates, ce qui indique que les animaux présentent des niveaux de base de l'expression des cytokines assez variés.

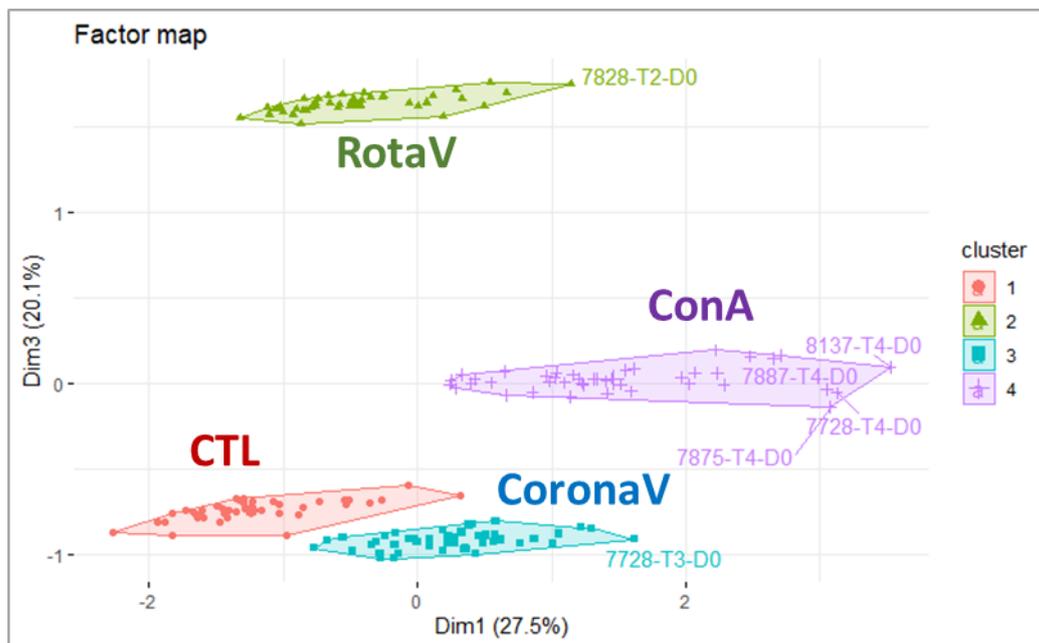


Figure 22 : Analyse intégrative de la réponse cellulaire aux différents ligands (J0)

L'analyse des données en tenant compte des 4 groupes constitués permet de mettre en évidence une relative homogénéité des groupes entre eux. Avant vaccination, on constate des différences mineures entre les groupes vaccinés et le groupe contrôle (**Figure 23**) :

- Le groupe BV (vacciné avec BOVIGEN SCOUR®) est significativement différent pour IFN γ et CCL4 avec le ligand ConA
- Le groupe RV (vacciné avec BOVILIS ROTAVEC CORONA®) l'est pour CXCL10 avec le ligand ConA
- Le groupe BV_MN (vacciné avec BOVIGEN SCOUR® et ayant reçu une injection de MULTIMIN™) l'est pour CCL4 avec les ligands CTL, CoronaV et ConA

Les données obtenues vis-à-vis du ligand ConA correspondent à la large distribution observée précédemment (**Figure 22**).

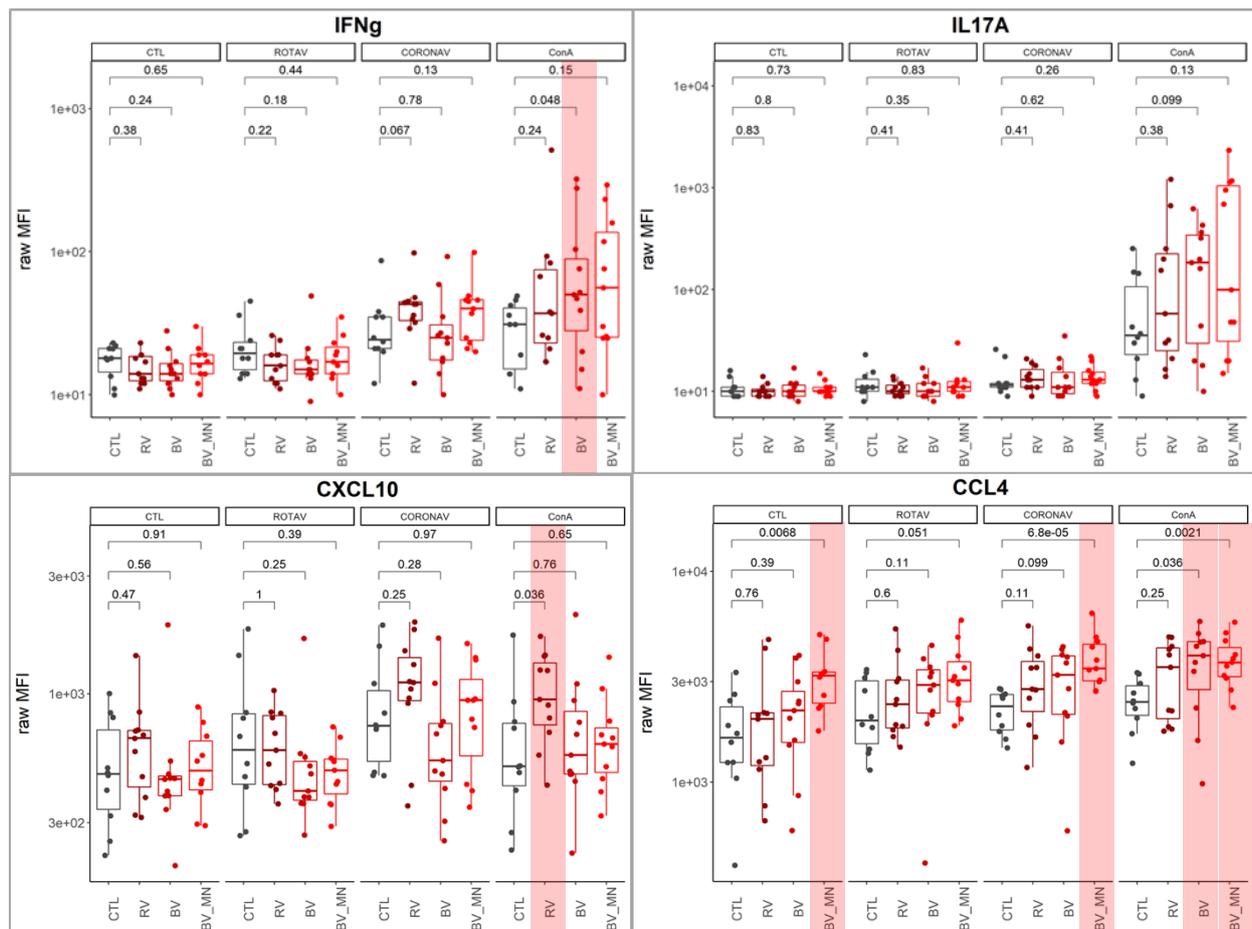


Figure 23 : Réponses cellulaires des groupes avant vaccination : exemple pour 4 cytokines

b. Réponse immunitaire induite chez la vache

i. Anticorps

La réponse anticorps a été de nouveau évaluée 28 jours après la vaccination (**Figure 24**). On constate que par rapport aux mesures réalisées à J0, les pourcentages d'inhibition de BRV et BCoV sont beaucoup plus élevés dans les groupes vaccinés. Ceci suggère une production intense d'anticorps à la suite de la vaccination. Les deux vaccins semblent équivalents en ce qui concerne cette réponse. Les résultats du groupe contrôle sont plus variés, avec des animaux présentant des statuts sérologiques allant de négatif à très positif, ce qui peut correspondre à la réponse induite par un passage viral dans l'élevage.

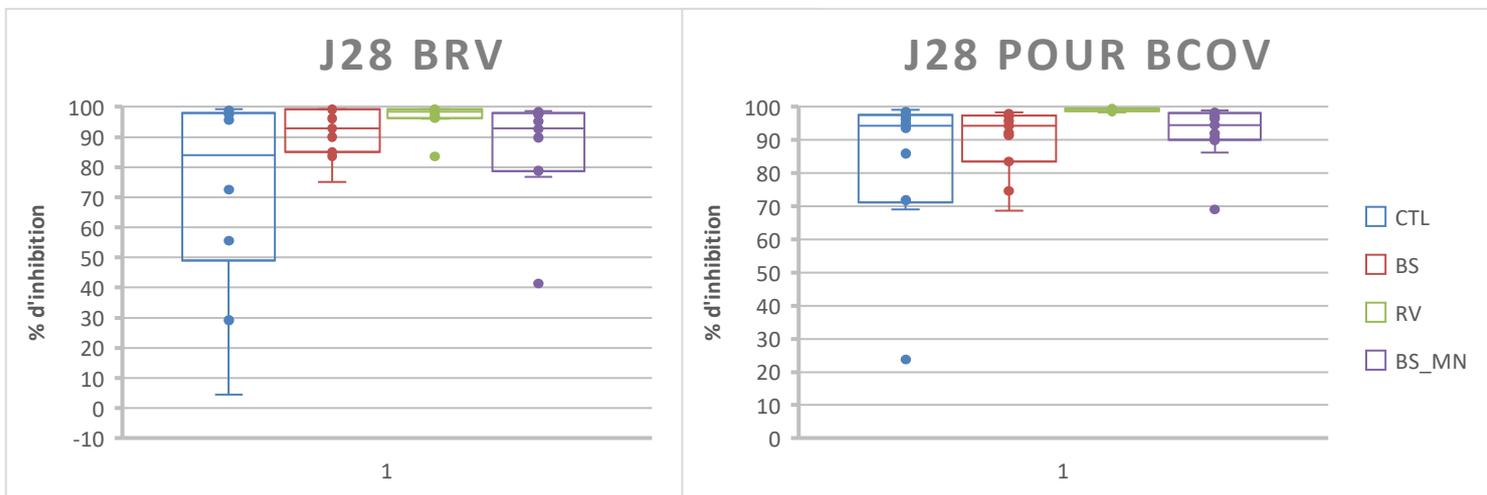


Figure 24 : Analyse sérologique à J28 vis-à-vis de BRV et BCoV

ii. Immunité cellulaire et cytokines

La réponse cellulaire a été réévaluée 28 jours après la vaccination. On constate que la réponse à J28 est globalement plus forte qu'à J0 : la sécrétion d'IFN γ est plus grande dans les groupes vaccinés. Les vaccins utilisés induisent donc une réponse cellulaire (**Figure 25**).

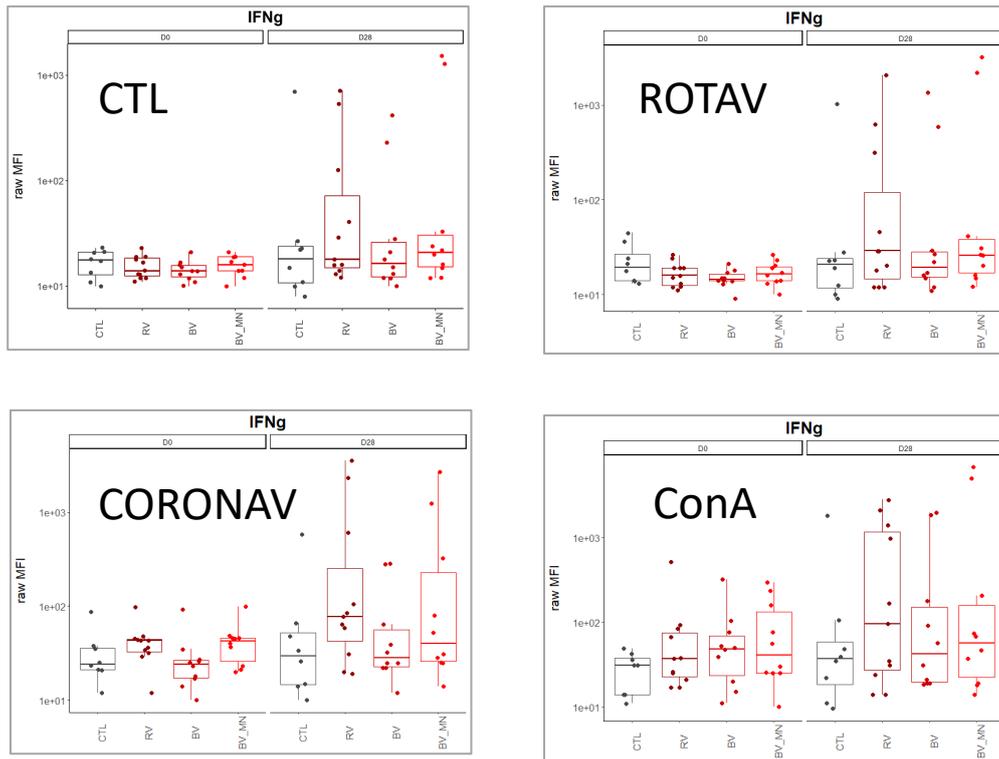


Figure 25 : Réponse cellulaire des groupes à J0 et J28 : exemple vis-à-vis de IFN γ

En revanche, on sait que les animaux n'étaient pas naïfs vis-à-vis de coronavirus au début de l'expérience. La réponse cellulaire en réponse à la vaccination a certainement été plus rapide car des cellules mémoires étaient déjà présentes et il est possible que le pic ait été atteint plus tôt (**Figure 14** page 44). Cette réponse cytokinique ne semble pas très différente de celle des animaux non vaccinés (**Figure 26**). On constate que dans le cas de IFN γ , aucune des p-valeurs n'est inférieure à 0,05. Pour CCL4, il existe des différences significatives par rapport au contrôle avec le ligand BRV dans le groupe BV, avec le ligand BCoV dans le groupe BV_MN et avec le ligand ConA dans le groupe BV_MN.

Dans la suite de l'analyse, seules les données à J28 ont été analysées en soustrayant la valeur de la condition témoin avec le milieu seul aux conditions d'analyse vis-à-vis de BCoV, BRV et du témoin positif ConA. De cette façon, on obtient la part liée à la réponse spécifique du ligand analysé en s'affranchissant de la forte variabilité du niveau de base entre vaches.

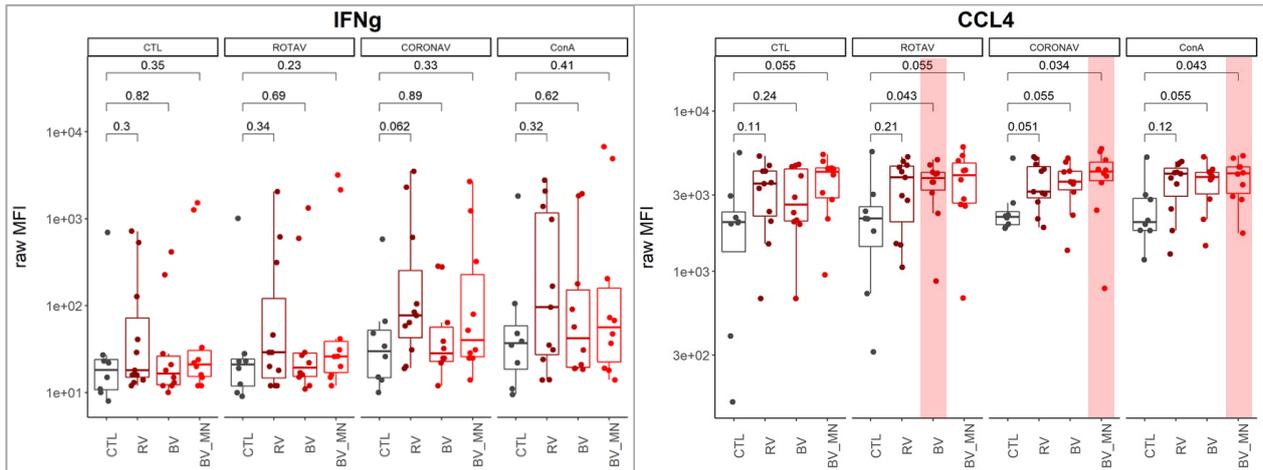


Figure 26 : Réponse cellulaire à J28 : exemple vis-à-vis de IFN γ et CCL4

Dans le cas de la stimulation avec le ligand BCoV, il y a une différence significative de la stimulation de sécrétion de CXCL10 et IFN γ induite par le vaccin BOVILIS ROTAVEC CORONA[®] par rapport au groupe non vacciné, mais également par rapport au groupe vacciné avec BOVIGEN SCOUR[®]. La sécrétion de IL-1RA est plus grande dans les groupes BS et RV par rapport au contrôle, mais elle n'est pas différente entre ces deux groupes (**Figure 27**).

Dans le cas de la stimulation avec BRV, aucune des réponses cellulaires induites n'est significativement différente de celle du groupe contrôle (**Annexe 7**).

L'analyse avec une PLS-DA permet, en prenant en compte les aires colorées en fonction des groupes, de constater que, pour le ligand BCoV, les vaches ayant une réponse cellulaire la plus forte font partie du groupe RV, ce qui est cohérent avec les résultats précédents (**Figure 28**). Au contraire, en ce qui concerne le ligand BRV, ce sont les vaches vaccinées avec BOVIGEN SCOUR[®] qui montrent une réponse cellulaire plus intense. Dans le cas du ligand témoin ConA, les aires correspondant aux groupes BV ou RV sont équivalentes.

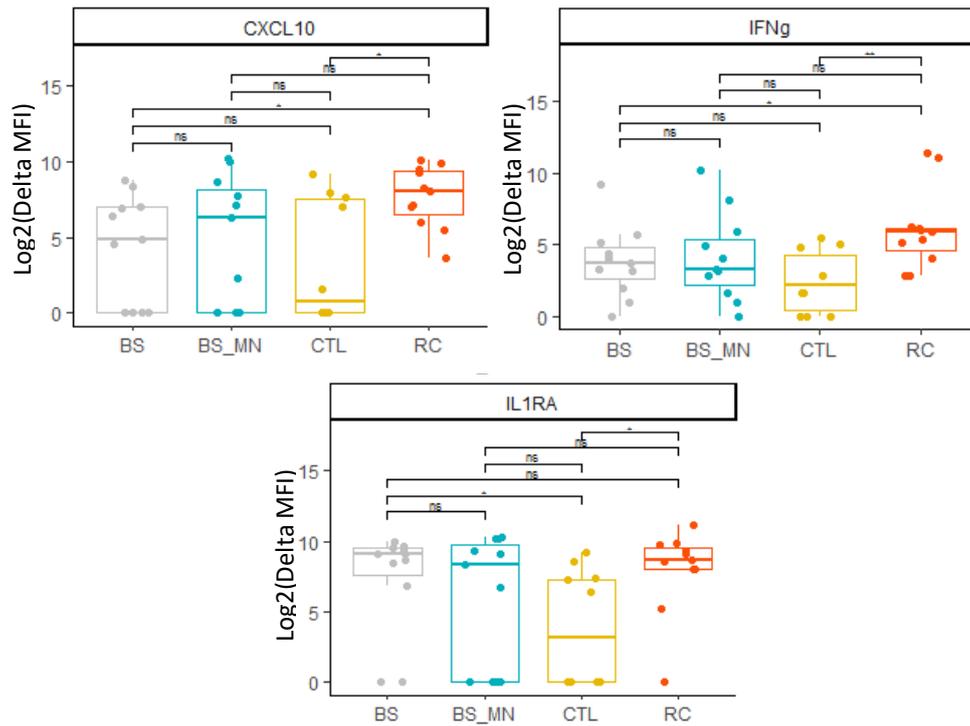


Figure 27 : Réponse cellulaire à J28 : exemples vis-à-vis de 3 cytokines avec le ligand BCoV

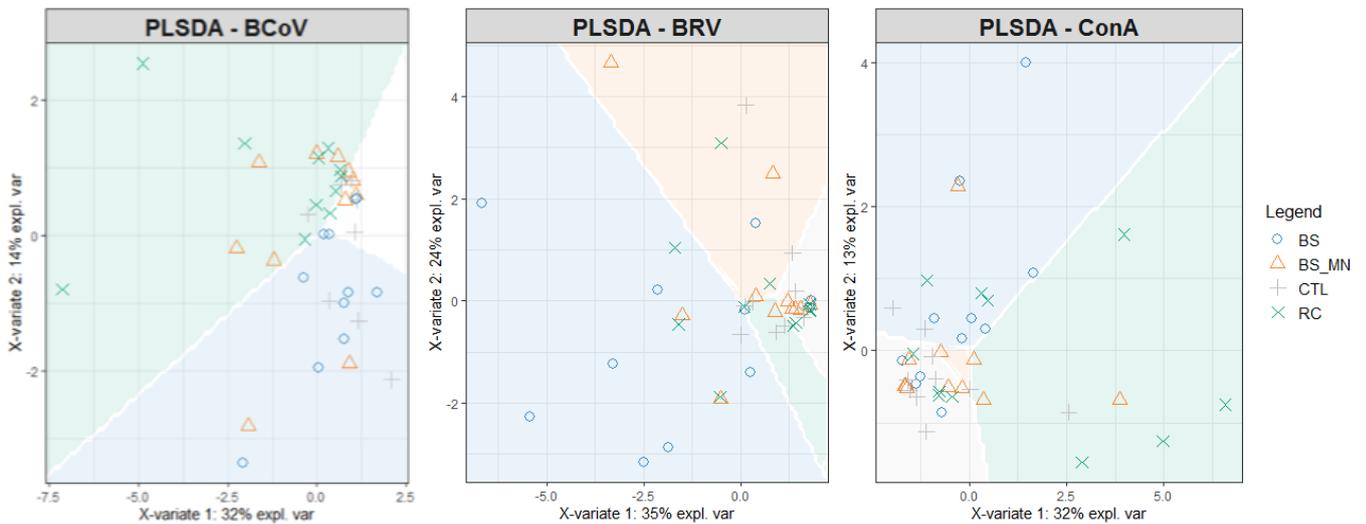


Figure 28 : Analyse PLSDA vis-à-vis du ligand BCoV, du ligand BRV et du ligand ConA

Si on compare les résultats obtenus en fonction des vagues de prélèvements (4 vagues entre janvier et avril), on constate que la réponse cellulaire induite est variable entre les vagues (identifiées par les points V1 à V4 sur la **Figure 29**, calculés en faisant la moyenne des réponses

cellulaires à J28 pour chaque vague). Cette variation est plus visible avec les ligands BCoV et ConA mais les cytokines qui y contribuent ne sont pas les mêmes.

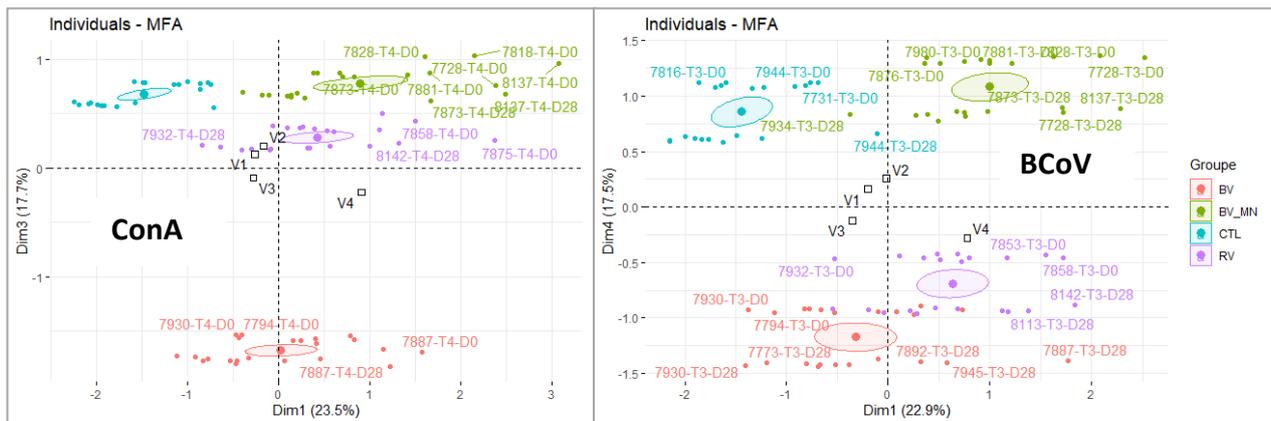


Figure 29 : Analyse factorielle multiple pour les ligands ConA et BCoV

c. Réponse immunitaire induite chez le veau

Le transfert de l'immunité cellulaire de la vache au veau n'a été que très peu étudié, contrairement au transfert des anticorps présents dans le colostrum. Dans la **figure 30**, on observe des résultats variés selon les cytokines. Chez les mères, on constate que les sécrétions des cytokines ne sont pas plus fortes avec les ligands BRV et BCoV par rapport au contrôle. Dans le cas de l'IL1 α , même avec la stimulation avec ConA, il n'y a pas de différence significative avec le contrôle. Chez les veaux, on a deux cas de figure :

- Dans le cas de IL17A et IFN γ , quel que soit le ligand utilisé, la sécrétion de ces cytokines est très faible, alors qu'elle n'était pas nulle chez leurs mères.
- Pour IL1 α , on a bien une sécrétion, mais pas de différence significative entre les 4 groupes.

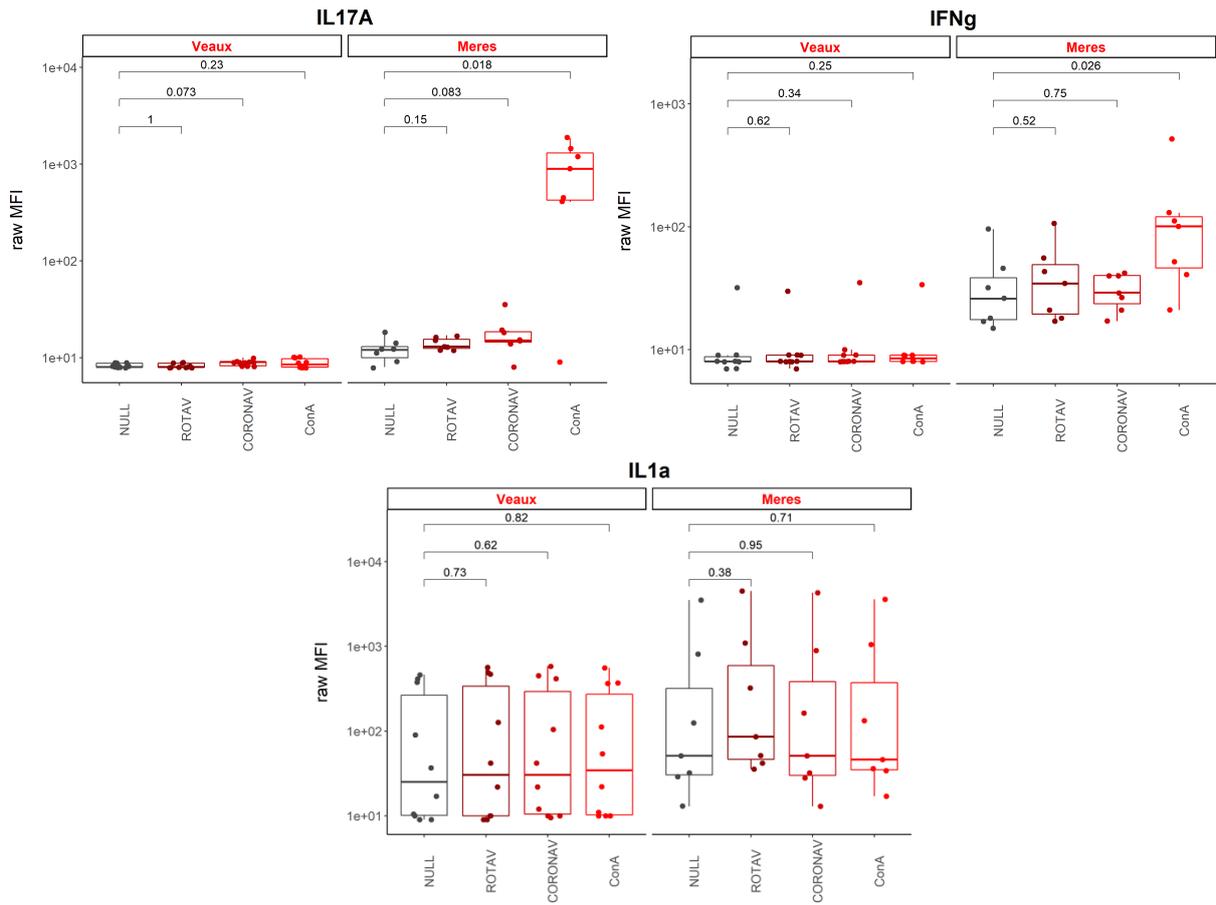


Figure 30 : Réponses cellulaires des veaux et des mères : exemple pour 3 cytokines

III. Discussion

Dans cette étude, l'objectif était d'évaluer le type et l'intensité de la réponse immunitaire induite par des vaccins contre les entérites néonatales en fonction des adjuvants présents. Idéalement, cette étude est plus facile à réaliser en recrutant des animaux naïfs vis-à-vis des agents pathogènes testés. Dans le cas contraire, leur organisme a déjà développé une réponse mémoire spécifique de ces agents et la réponse à une seconde stimulation est certes plus rapide, mais avec des caractéristiques déjà fixées. L'élimination du pathogène à la suite d'une première exposition est généralement plus rapide et seules des cellules mémoires avec des capacités de réponse augmentées sont présentes. Dans le cadre de cette étude, il n'a pas été possible d'inclure des animaux totalement naïfs, notamment vis-à-vis de BCoV, même s'il s'agissait de génisses n'ayant jamais été vaccinées et qui *a priori* étaient moins susceptibles que des vaches multipares d'avoir rencontré BRV et BCoV. De fait, les prélèvements réalisés 28 jours après la vaccination étaient sans doute trop tardifs pour évaluer l'intensité de la réponse cellulaire. Le pic d'activité des lymphocytes T effecteurs était probablement dépassé et le retour vers un niveau de base déjà bien entamé. Le choix de cet intervalle entre les deux prélèvements a été fait car il était le plus adapté pour évaluer la réponse anticorps. Pour évaluer au mieux la réponse cellulaire, il aurait sans doute été préférable de réaliser les prélèvements une dizaine de jours seulement après la vaccination.

Les prélèvements ont été réalisés en quatre vagues distinctes entre janvier et avril afin de vacciner les vaches dans un intervalle compris entre 6 et 13 semaines avant la date de mise-bas supposée. Ceci introduit 2 biais :

- Les prélèvements n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions : les vaches ont certes toutes reçu la même ration, ont été élevées dans les mêmes conditions, mais la saison hivernale implique une plus grande circulation d'agents pathogènes. Il peut y avoir eu des infections subcliniques passées inaperçues, faisant perdre le statut naïf sélectionné avant l'étude à certains animaux s'ils ont été infectés par BRV ou BCoV, ou si des réactions croisées sont apparues. Ceci explique peut-être l'écart des résultats obtenus lors de la quatrième vague de prélèvements par exemple.

- Les vaches n'ont pas été vaccinées exactement au même stade de gestation. L'écart entre la 6^e et la 13^e semaine avant la mise-bas supposée n'est pas très grand, mais la réponse immunitaire évolue très vite à ce stade. De plus, pour les vaches vaccinées 6 semaines avant la mise-bas, les seconds prélèvements sanguins ont donc été réalisés 2 semaines avant le terme. Or, il est avéré que l'immunité est altérée chez les vaches entre la 3^e semaine avant et la 3^e semaine après le vêlage (Mallard et al., 1998). La réponse des lymphocytes lors d'une infection est diminuée, ce qui pourrait expliquer des résultats à la stimulation avec les ligands BRV et BCoV plus faibles et moins différenciés des résultats de la condition témoin sans stimulation. Il aurait donc été plus approprié de vacciner les vaches le plus tôt possible au cours de leur gestation, tout en respectant le minimum de 12 semaines avant la date présumée de mise-bas.

Il aurait également été idéal de ne réaliser qu'une seule vague d'expériences avec des vaches ayant une date supposée de mise-bas la plus proche possible entre elles, afin de s'affranchir de la saison, des éventuels pathogènes circulants et de l'immunité variable en fonction du stade de gestation.

Les mesures de la réponse cellulaire réalisées chez les mères au moment de la mise-bas ont également montré des augmentations peu marquées, même lorsque la stimulation avait été réalisée avec le ligand ConA. Ces résultats s'expliquent encore une fois par la baisse importante de l'immunité dans la période du péripartum et donc l'absence de lymphocytes T mobilisables qui réagiraient à la stimulation par ConA.

A J0, on a pu constater que la stimulation avec le ligand BCoV entraînait une sécrétion plus élevée de cytokines. On savait que les animaux n'étaient pas naïfs vis-à-vis de ce pathogène, c'était donc un résultat attendu. En revanche, cela nous permet d'affirmer que la protéine spike choisie comme ligand était appropriée, car elle entraîne une forte réponse. A J28, bien qu'on observe une stimulation avec le ligand BRV, celle-ci n'est pas intense et véritablement significative par rapport au groupe contrôle. On peut alors se demander si le choix de l'antigène, des peptides issus de la protéine de la capsid VP7 du rotavirus, a été optimal. Il

faudrait réaliser les mêmes stimulations en utilisant VP4 ou VP6, d'autres protéines de la capsid de BRV, pour voir si la réponse à la stimulation est plus marquée.

Outre le choix des peptides utilisés pour la stimulation, la question de la concentration de ces peptides dans les milieux préparés pour les tubes S-Monovette® se pose également. Dans cette étude, les concentrations avaient été arbitrairement choisies à 0,2 µg/mL. Lorsque ce type d'évaluation de la réponse cellulaire est réalisée chez l'homme, des concentrations en peptides jusqu'à 1 µg/mL sont utilisées. La sécrétion limitée de cytokines pourrait alors s'expliquer par une stimulation trop faible due à une concentration trop basse pour examiner ces réponses.

Chez les veaux, on constate que plusieurs cytokines sont absentes et que d'autres présentent des concentrations équivalentes quelle que soit la condition de stimulation. Ceci pourrait s'expliquer de deux façons :

- Le colostrum contient un certain nombre de cytokines. Celles-ci peuvent, après ingestion du colostrum par le veau, passer la barrière intestinale comme les anticorps et ainsi gagner la circulation sanguine. Parmi les cytokines testées dans notre étude, certaines sont soit absentes du colostrum, soit ne passent pas la barrière intestinale, ce qui expliquerait leur absence dans le plasma du veau.
- Toutes les cytokines ne sont pas sécrétées par les seuls lymphocytes T. Certaines, comme IL-1 α par exemple, sont également sécrétées par d'autres cellules telles que les macrophages, neutrophiles, cellules épithéliales et endothéliales. Ceci justifierait donc un niveau de base présent dans le plasma du veau dès la naissance.

Ces deux hypothèses ne sont d'ailleurs pas incompatibles : il est possible que le veau absorbe une partie des cytokines du colostrum et qu'une autre partie soit sécrétée par des cellules présentes dans le sang, dont les lymphocytes T. Dans les deux cas, les résultats présentés chez le veau ne sont pas significativement différents entre les différentes conditions du test, indiquant une très faible activité de production de cytokines, y compris en réponse à ces conditions. En particulier, il n'y a pas de différence entre la condition témoin et celle avec le ligand ConA : ceci laisse donc penser à une absence d'activité sécrétoire des lymphocytes T, qui sont soit épuisés, soit incapables de réponse à la ConA dans les 24 à 36 premières heures

de vie du veau. Il serait intéressant de faire une étude dans les premières semaines de vie du veau pour étudier à partir de quel âge on observe une réponse cellulaire fonctionnelle. Quoiqu'il en soit, la réponse cellulaire de la mère ne semble pas se transmettre au veau, ou du moins pas à un niveau détectable par cette approche, contrairement à ce qu'on peut observer pour la réponse humorale avec le transfert des anticorps maternels protecteurs pour le veau.

La réponse cellulaire induite par les vaccins dans cette étude n'est pas très forte, en particulier vis-à-vis du rotavirus. Il semble que l'adjuvant huileux utilisé dans le vaccin BOVILIS ROTAVEC CORONA® induise toutefois une réponse cellulaire. Le résultat aurait peut-être été différent si seul l'alun avait été utilisé. Quoiqu'il en soit, il n'y a pas de différence significative de la réponse cellulaire induite par les deux vaccins utilisés dans cette étude.

Dans la vaccination contre les entérites néonatales des veaux, la réponse immunitaire que l'on cherche à privilégier est de toute évidence une réponse anticorps. En effet, on a pu constater que, même si une réponse cellulaire est induite chez la mère, elle n'est pas transmise de façon détectable au veau. Il est donc difficile de penser, sur la base de ces résultats, qu'elle puisse lui conférer une protection. Le but de la vaccination reste donc de maximiser la production d'anticorps dans le sérum de la mère afin d'avoir par extension une forte concentration des anticorps spécifiques des entéropathogènes dans le colostrum, puisqu'il existe une assez bonne corrélation entre ces deux compartiments. La réponse anticorps induite par les deux vaccins utilisés dans cette étude est équivalente et de forte intensité. A cela, il faut évidemment coupler une ingestion du colostrum en quantité suffisante et le plus tôt possible après la naissance, de sorte à obtenir un transfert optimal de l'immunité passive.

Conclusion

Le choix de l'adjuvant dans un vaccin permet d'orienter la réponse immunitaire induite plutôt vers la production d'anticorps ou vers une réponse cellulaire. Il doit être réfléchi en fonction du ou des agents contre lesquels le vaccin est dirigé, afin de générer une protection la meilleure possible.

Dans le cas particulier des entérites néonatales chez le veau, l'adjuvant choisi pour un vaccin doit plutôt être promoteur d'une réponse anticorps chez la mère, de sorte à induire une concentration en anticorps spécifiques dans le colostrum la plus élevée possible. En effet, les anticorps sont primordiaux dans l'immunité du jeune veau, car il en est totalement dépourvu à la naissance, et ceux-ci aident à sa protection vis-à-vis de divers agents pathogènes dans les premiers jours de vie, avant qu'il ne développe sa propre immunité.

La vaccination des vaches gestantes contre les entérites néonatales des veaux doit impérativement s'accompagner d'une bonne conduite d'élevage avec en particulier une distribution d'un colostrum de bonne qualité dès les premières heures de vie en quantité suffisante. Le veau doit naître dans un environnement le plus propre possible afin de limiter son contact avec des agents pathogènes responsables de l'apparition de diarrhée.

La mise en place de protocoles de vaccination doit être encouragée dans les élevages, car ils participent à la réduction de l'utilisation des antibiotiques, mais permettent aussi d'améliorer les performances techniques telles que le gain moyen quotidien du veau ou les indices liés à la reproduction, selon les maladies contre lesquelles les vaccins sont utilisés. Ces protocoles doivent être réfléchis conjointement par l'éleveur et le vétérinaire : ils doivent correspondre aux problématiques apparentes dans l'élevage et doivent prendre place dans une démarche plus large visant à optimiser la conduite de l'élevage, afin de limiter la circulation des divers agents pathogènes.

Bibliographie

- ABBAS, A.K. (2003) *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders.
- ADDINSOFT XLSTAT : Régression par les moindres carrés partiels (PLS). [Online] Available from: <https://www.xlstat.com/fr/solutions/fonctionnalites/regression-par-moindres-carres-partiels-pls> [Accessed 19/09/2022].
- ALKAN, F. et al. (2010) Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997–2008. *Veterinary Microbiology*, 141(3–4), pp. 231–237.
- AMMAR, S.S.M. et al. (2014) Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, pp. S318–S322.
- ANSES (2012) Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / Rotavirus. [Online] Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2012sa0031Fi.pdf> [Accessed 11/07/2022].
- BADARACCO, A. et al. (2013) Phylogenetic analyses of typical bovine rotavirus genotypes G6, G10, P[5] and P[11] circulating in Argentinean beef and dairy herds. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, pp. 18–30.
- BARTELS, C.J.M. et al. (2010) Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 93(2–3), pp. 162–169.
- BELLINZONI, R.C. et al. (1989) Efficacy of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus vaccine in the control of calf diarrhoea in beef herds in Argentina. *Vaccine*, 7(3), pp. 263–268.
- BERTONI, E. et al. (2020) First report of group A rotavirus and bovine coronavirus associated with neonatal calf diarrhea in the northwest of Argentina. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), pp. 2761–2768.
- BOILEAU, M.J. and KAPIL, S. (2010) Bovine Coronavirus Associated Syndromes. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(1), pp. 123–146.
- BOK, M. et al. (2015) Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Veterinary Microbiology*, 181(3–4), pp. 221–229.
- BOLON, A. et al. (2013) Prévalence des agents responsables d'entérite néonatale bovine en

- Bourgogne : place des calicivirus. *Recueil des Journées Nationales 2013*, pp. 767–772.
- BRADLEY, W.G., HOLM, K.N. and TANAKA, A. (2014) An orally active immune adjuvant prepared from cones of *Pinus sylvestris*, enhances the proliferative phase of a primary T cell response. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), p. 163.
- CASTRUCCI, G. (1988) Neonatal calf diarrhea induced by rotavirus. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis*, 11(2), pp. 71–84.
- CASTRUCCI, G. et al. (1984) The efficacy of colostrum from cows vaccinated with rotavirus in protecting calves to experimentally induced rotavirus infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 7(1), pp. 11–18.
- CHANTREAU, J. and AMIOT, J. (2013) Echec de prévention en entérites néonatales bovines : quelques pistes pour s'en sortir. *Recueil des Journées Nationales 2013*, pp. 175–184.
- CHARREYRE, C. and AUDONNET, J.-C.F. (2017) Nouvelles stratégies d'innovations vaccinales et leurs applications en médecine vétérinaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 170(1), pp. 14–21.
- CHASE, C.C.L., HURLEY, D.J. and REBER, A.J. (2008) Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), pp. 87–104.
- CHO, Y. and YOON, K.-J. (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*, 15(1), p. 1.
- CIARLET, M. (2001) Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Current Opinion in Microbiology*, 4(4), pp. 435–441.
- CLOS, J. (2012) *L'immunité chez les animaux et les végétaux : aspects fondamentaux et physiopathologiques*. Paris: Médecine sciences publications.
- COLLINS, P. et al. (2014) Detection and characterisation of bovine rotavirus in Ireland from 2006–2008. *Irish Veterinary Journal*, 67(1), p. 13.
- COURA, F.M. et al. (2015) Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Tropical Animal Health and Production*, 47(1), pp. 3–11.
- DEA, S., ROY, R.S. and ELAZHARY, M.A. (1981) [Calf coronavirus neonatal diarrhea. A literature review (author's transl)]. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 22(3), pp. 51–58.
- DUNN, A. et al. (2017) Effect of concentrate supplementation during the dry period on

colostrum quality and effect of colostrum feeding regimen on passive transfer of immunity, calf health, and performance. *Journal of Dairy Science*, 100(1), pp. 357–370.

FERNANDEZ, F. (1998) Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine*, 16(5), pp. 507–516.

FOSTER, D.M. and SMITH, G.W. (2009) Pathophysiology of Diarrhea in Calves. p. 25.

FRANCOZ, D. and NICHOLS, S. (2017) *Guide pratique des maladies du veau*. Paris : Éditions Med'com.

GOMEZ, D.E. and WEESE, J.S. (2017) Viral enteritis in calves. *The Canadian Veterinary Journal*, 58, pp. 1267–1274.

GUIN, B. and MAILLARD, R. (2018) Consensus professionnel : Les entérites néonatales (ENN) du veau. *Recueil des Journées Nationales 2018*, pp. 115–122.

GUNN, L. et al. (2015) Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Irish Veterinary Journal*, 68(1), p. 31.

INSTITUT DE L'ÉLEVAGE (ed.) (2008) *Maladies des bovins : manuel pratique*. 4e éd. Paris : Éd. France agricole.

KAPLON, J. et al. (2013) Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. *Vaccine*, 31(20), pp. 2433–2440.

LACROUTE, H. et al. (2014) Enquête GTV03 sur les colibacilles du veau allaitant en Allier en 2012 et 2013 : résultats (transfert colostrale, typage et antibiorésistance), discussion et conséquences pratiques pour le vétérinaire praticien. *Recueil des Journées Nationales 2014*, pp. 673–684.

LEE, L.C., LIONG, C.-Y. and JEMAIN, A.A. (2018) Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *The Analyst*, 143(15), pp. 3526–3539.

LEROUX-ROELS, I. et al. (2007) Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 370(9587), pp. 580–589.

LOTFOLLAHZADEH, S. et al. (2020) Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Veterinary Medicine and Science*, 6(4), pp. 686–694.

MALLARD, B.A. et al. (1998) Alteration in Immune Responsiveness During the Peripartum Period

and Its Ramification on Dairy Cow and Calf Health. *Journal of Dairy Science*, 81(2), pp. 585–595.

MESSAND, E., DUTHU, A. and BECKER, C.A.M. (2019) Signes cliniques et examens complémentaires : comment les compiler pour avoir un pronostic fiable dans le cadre des gastroentérites néonatales chez les bovins ? p. 6.

MILLEMANN and MAILLARD (2007) Les agents entéropathogènes du veau. [Online] Available from:

https://www.researchgate.net/publication/286624288_Les_agents_enteropathogenes_du_veau_-_Calf_enteropathogenic_agents.

PAPP, H. et al. (2013) Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Veterinary Microbiology*, 165(3–4), pp. 190–199.

POLEWICZ, M. et al. (2013) Novel vaccine formulations against pertussis offer earlier onset of immunity and provide protection in the presence of maternal antibodies. *Vaccine*, 31(31), pp. 3148–3155.

RAVARY, B., SATTler, N. and ROCH, N. (2006) *Néonatalogie du veau*. Rueil-Malmaison : les Éd. du 'Point vétérinaire'.

RENAUD, D.L. et al. (2018) Short communication: Validation of methods for practically evaluating failed passive transfer of immunity in calves arriving at a veal facility. *Journal of Dairy Science*, 101(10), pp. 9516–9520.

RENAUD, D.L. (2021) The effect of *Cryptosporidium parvum*, rotavirus, and coronavirus infection on the health and performance of male dairy calves. 104(2), p. 13.

RIDREMONT, B. (2021) Les coronavirus des bovins : clinique, épidémiologie, immunité et prévention. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 174, [Online] Available from: doi.org/10.3406/bavf.2021.70929 [Accessed 07/10/2021].

ROCHA, T.G. et al. (2017) Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. *Tropical Animal Health and Production*, 49(4), pp. 783–790.

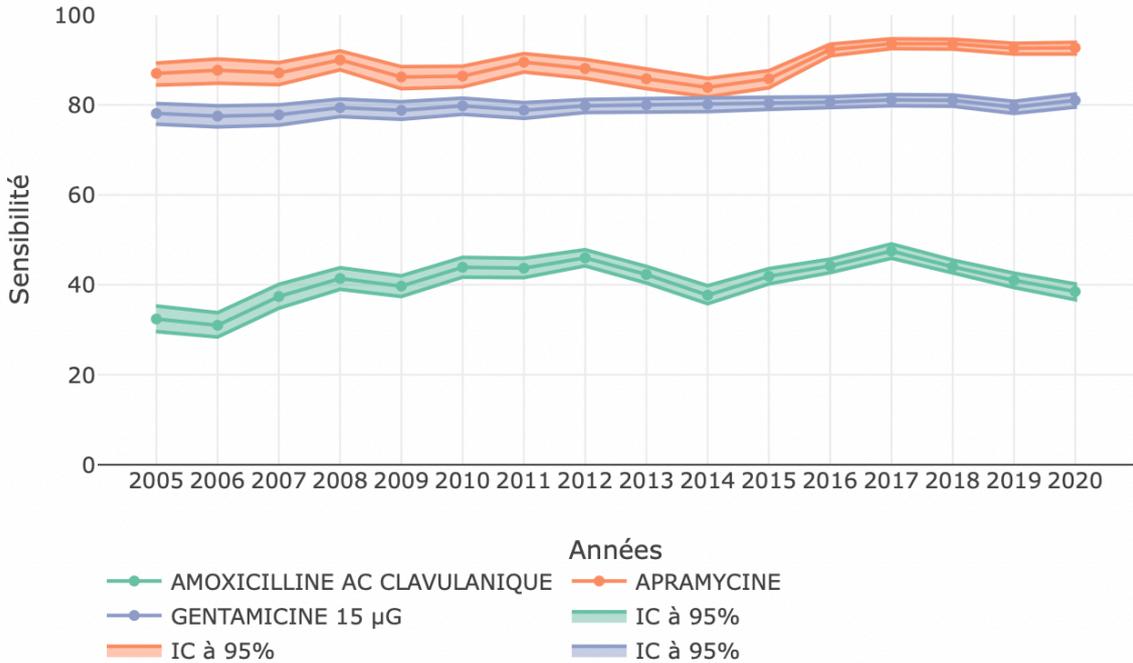
SAFAVI, A. (2012) A Case-Control Study of Association between Diarrhea in Newborn Calves and Infection with Rotavirus and Coronavirus in Some Industrial Dairy Herds of Mashhad Area, Iran in 2008. *Archives of Razi Institute*, 67(1), p. 8.

SALMON, H. et al. (2009) Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(3), pp. 384–393.

- SINGH, S. et al. (2020) Immunohistochemical and molecular detection of natural cases of bovine rotavirus and coronavirus infection causing enteritis in dairy calves. *Microbial Pathogenesis*, 138, p. 103814.
- SINNO-TELLIER, S., JEGOU, F. and PINEAU, X. (2020) Vaccins vétérinaires : les adjuvants huileux augmentent le risque de complications en cas de piqûre accidentelle chez l'Homme. *Vigil'Anses*, 12.
- SMITH, B.P. (2019) *Large animal internal medicine*. 6th edition. St Louis, MO: Elsevier Inc.
- SMITH, H.V. et al. (2007) Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 149(1–2), pp. 29–40.
- SOLER, E. et al. (2005) Production of Two Vaccinating Recombinant Rotavirus Proteins in the Milk of Transgenic Rabbits. *Transgenic Research*, 14(6), pp. 833–844.
- TIZARD, I.R. (2021) *Vaccines for veterinarians*. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- TIZARD, I.R. (2013) *Veterinary immunology*. 9th ed. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders.
- VAN ZAANE, D., IJZERMAN, J. and DE LEEUW, P.W. (1986) Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrum with or without rotavirus antibody. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 11(1), pp. 45–63.
- VANOPDENBOSCH, E. et al. (1981) Evolution des anticorps anti rota dans le lait de vaches traitées en fin de gestation soit par le vaccin anti rota complet, soit par l'adjuvant seul. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 4(3–4), pp. 293–300.
- VERMOUT, S. et al. (2003) Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 147, pp. 393–401.

ANNEXES

Annexe 1 : Évolution des sensibilités de 3 antibiotiques au cours des 15 dernières années dans le cadre des entérites néonatales à *Escherichia coli* (Source : Resapath)



Annexe 2 : Extraits du RCP de BOVIGEN SCOUR®

RESUME DES CARACTERISTIQUES DU PRODUIT

1. Dénomination du médicament vétérinaire

BOVIGEN SCOUR

2. Composition qualitative et quantitative

Une dose de 3 mL contient :

Substance(s) active(s) :

Rotavirus bovin inactivé..... souche TM-91, sérotype G6P1	≥ 6,0 log ₂ (VNT)*
Coronavirus bovin inactivé..... souche C-197	≥ 5,0 log ₂ (HIT)**
Escherichia coli inactivée souche EC/17 exprimant l'adhésine F5 (K99)	≥ 44,8 % d'inhibition (ELISA)***

Adjuvant(s) :

Montanide ISA 206 VG..... 1,60 mL

Excipient(s) :

Formaldéhyde..... max. 1,50 mg
Thiomersal..... max. 0,36 mg

4. Informations cliniques

4.1. Espèces cibles

Bovins (vaches et génisses gestantes).

4.2. Indications d'utilisation, en spécifiant les espèces cibles

Chez les vaches et génisses gestantes :

Immunisation active des vaches et génisses gestantes afin de produire des anticorps contre les antigènes des adhésines d'*E. coli* F5 (K99), les rotavirus et les coronavirus.

Quand les veaux sont nourris par du colostrum de vaches vaccinées pendant leur première semaine de vie, il a été démontré que les anticorps présents réduisaient la sévérité des diarrhées causées par les rotavirus bovins, les coronavirus bovins et les *E. coli* entéropathogènes F5 (K99) et réduisaient l'excrétion des rotavirus ou coronavirus bovins par les veaux infectés.

Début de l'immunité : l'immunité passive débute avec l'administration de colostrum et dépend de son apport en quantité suffisante au veau nouveau-né.

4.9. Posologie et voie d'administration

Voie intramusculaire.

Respecter les procédures d'asepsie habituelles.

Utiliser exclusivement des seringues et des aiguilles stériles.

Amener le vaccin à température ambiante avant utilisation.

Bien secouer le flacon avant et périodiquement pendant l'utilisation afin de s'assurer que le sédiment soit totalement dissous avant administration.

Pour les présentations de 90 ml et 450 ml, il est recommandé d'utiliser un pistolet doseur automatique pour éviter d'endommager le bouchon en le perçant à de multiples reprises.

Une dose = 3 mL

Une dose à chaque gestation, administrée entre la 12^{ème} et la 3^{ème} semaine avant la date prévue du vêlage.

Administration du colostrum

La protection des veaux dépend de l'ingestion adéquate de colostrum de vaches vaccinées. Des mesures doivent être prises pour s'assurer que les veaux reçoivent des quantités suffisantes de colostrum dans les tous premiers jours de leur vie. Si les veaux ne reçoivent pas assez d'anticorps par le colostrum peu après leur naissance, il y aura un échec de transfert passif d'anticorps. Il est important que tous les veaux reçoivent autant de colostrum que possible issu de la première traite, et dans les six heures qui suivent le vêlage. Il est recommandé d'administrer au moins 3 litres de colostrum dans les premières 24 heures soit environ 10% du poids d'un veau.

Pour obtenir des résultats optimaux et réduire la pression d'infection dans la ferme, il convient d'adopter

//www.ircp.anmv.anses.fr/ircp.aspx?NomMedicament=BOVIGEN+SCOUR

Pag

07/07/20

une politique de vaccination complète du troupeau.

Annexe 3 : Extraits du RCP de BOVILIS ROTAVEC CORONA®

RESUME DES CARACTERISTIQUES DU PRODUIT

1. Dénomination du médicament vétérinaire

BOVILIS ROTAVEC CORONA

2. Composition qualitative et quantitative

Une dose de 2 mL contient :

Substance(s) active(s) :

Rotavirus bovin inactivé, souche UK-Compton,..... ≥ 874 U*

sérotype G6 P5

Coronavirus inactivé souche Mebus $\geq 3,41 \log_{10}/\text{mL}$ titre anticorps ELISA**

Adhésine *E. coli* F5 (K99) $\geq 0,64$ titre anticorps ELISA (densité optique)

Adjuvant(s) :

Huile minérale légère / émulsifiant 1,40 mL

Hydroxyde d'aluminium 2,45 – 3,32 mg

Excipient(s) :

Thiomersal 0,032 - 0,069 mg

Formaldéhyde $\leq 0,34$ mg

4. Informations cliniques

4.1. Espèces cibles

Bovins (vaches et génisses gestantes).

4.2. Indications d'utilisation, en spécifiant les espèces cibles

Chez les vaches et génisses gestantes :

- Immunisation active afin de produire des anticorps contre les adhésines d'*E. coli* F5 (K99), les rotavirus et coronavirus. Lorsque les veaux reçoivent du colostrum provenant de vaches vaccinées pendant les deux à quatre premières semaines de leur vie, il a été démontré que ces anticorps :
 - réduisent la sévérité de la diarrhée provoquée par *E. coli* F5 (K99),
 - réduisent l'incidence des diarrhées provoquées par les rotavirus,
 - réduisent l'excrétion des virus par les veaux infectés avec des rotavirus et coronavirus.

Mise en place de l'immunité : l'immunité passive contre tous les principes actifs commencera à partir du début de la prise de colostrum.

Durée de l'immunité : chez les veaux artificiellement nourris avec des colostrums mélangés, la protection continuera jusqu'à ce que l'administration de colostrum cesse. Chez les veaux allaités naturellement à la mamelle, la protection persistera pendant au moins 7 jours contre le rotavirus et au moins 14 jours contre le coronavirus.

4.9. Posologie et voie d'administration

Utilisation Intramusculaire.

Bien mélanger avant utilisation. Les seringues et les aiguilles doivent être stérilisées avant l'injection. L'injection doit être réalisée au niveau d'une zone de peau propre et sèche en prenant des précautions contre la contamination.

Des précautions particulièrement strictes doivent être prises contre la contamination du vaccin.

L'utilisation d'une seringue multidose est recommandée pour éviter le ponctionnage excessif du bouchon. Lorsque le flacon a été ponctionné pour la première fois il peut être utilisé une nouvelle fois durant les 28 prochains jours, puis éliminé directement après utilisation.

Administration :

Administrer une dose unique de 2 mL par animal. Le site recommandé pour l'injection est au niveau de la face latérale de l'encolure. L'administration de la dose unique doit être réalisée durant chaque gestation entre la 12^{ème} semaine et la 3^{ème} semaine avant la date présumée de vêlage.

Prise du colostrum :

La protection des veaux dépend de la présence physique des anticorps colostraux (provenant des vaches vaccinées) dans les intestins pendant les 2 à 3 premières semaines de vie jusqu'à ce qu'ils développent leur propre immunité. Il est donc essentiel de s'assurer d'une prise de colostrum adéquate durant toute la période colostrale pour optimiser l'efficacité de la vaccination. Tous les veaux doivent recevoir de leur mère une quantité adéquate de colostrum dans les 6 heures qui suivent leur naissance. Les veaux allaités continueront à recevoir de façon appropriée du colostrum naturellement par les tétées des mères vaccinées.

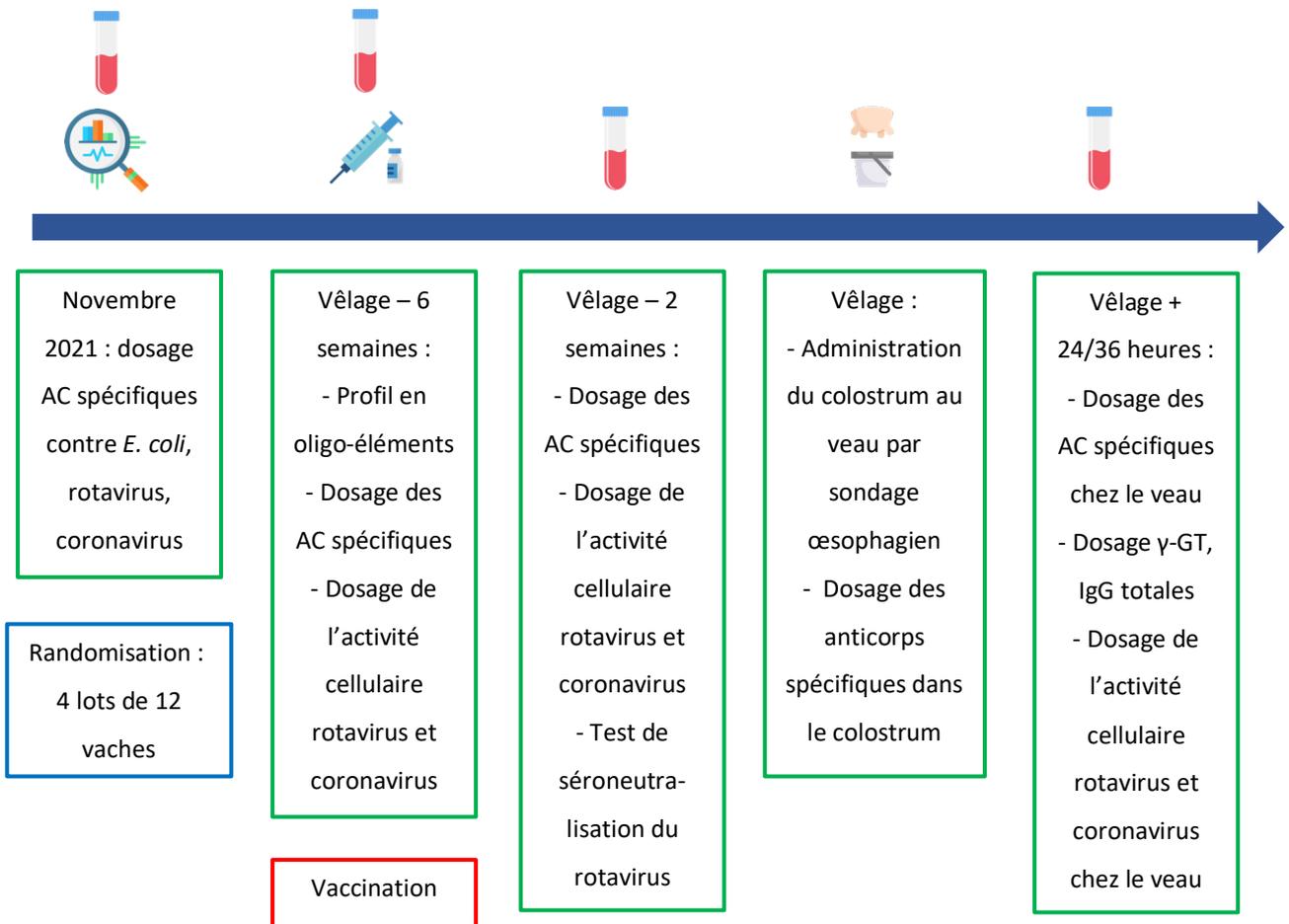
Dans les troupeaux laitiers, le colostrum/lait des 6 à 8 premières traites des vaches vaccinées doit être mélangé. Le colostrum peut être conservé à une température inférieure à 20°C, et doit être utilisé aussitôt que possible car les niveaux en immunoglobulines peuvent chuter jusqu'à 50 % après 28 jours de conservation. Lorsque cela est possible, il est recommandé de le conserver à 4°C. Les veaux seront nourris avec ce mélange à raison de 2,5 à 3,5 litres par jour (en fonction de leur poids corporel) pendant les deux premières semaines de leur vie.

De meilleurs résultats seront obtenus si une politique de vaccination du troupeau entier est adoptée. Cela assure, chez les veaux, un niveau minimal d'infection et d'excrétion virale consécutive. Par conséquent, le niveau global de pression d'infection sur l'exploitation est réduit.

**Annexe 4 : Vaccins commercialisés contre les pathogènes les plus fréquents responsables
d'entérites néonatales**

Nom déposé (laboratoire)	Valences utilisées				Adjuvant(s)	Voie d'administration	Protocole recommandé de primovaccination
	<i>E.coli</i>	Rotavirus	Coronavirus	Salmonelles			
BOVIGEN SCOUR (Virbac)	+	+	+		Montanide ISA 206 VG	IM	Une dose entre la 12 ^e et la 3 ^e semaine avant mise-bas
BOVILIS ROTAVEC CORONA (MSD Santé Animale)	+	+	+		Huile minérale + hydroxyde d'aluminium	IM	Une dose entre la 12 ^e et la 3 ^e semaine avant mise-bas
CORONIFFA RC (Boehringer Ingelheim)		+	+		Huile paraffine + éther d'acides gras et de polyols + éther d'alcools gras et de polyols	SC	Une dose 1 à 3 mois avant la mise-bas puis une dose minimum 2 semaines après
FENCOVIS (Boehringer Ingelheim)	+	+	+		Hydroxyde d'aluminium + saponines de quillaia	IM	Une dose entre la 12 ^e et la 3 ^e semaine avant mise-bas
IMOCOLIBOV (Boehringer Ingelheim)	+				Hydroxyde d'aluminium + saponine	SC	Une dose 2 à 6 semaines avant la mise-bas
SALMOPAST (Boehringer Ingelheim)				+	Hydroxyde d'aluminium	SC	Adultes : 2 injections à 4 semaines d'intervalle Jeunes : 2 injections à 2-4 semaines d'intervalle dès 8 jours d'âge
SCOURGUARD 3 (Zoetis)	+	+	+		Hydroxyde d'aluminium	IM	Deux doses à au moins 2 semaines d'intervalle, la 2 ^e de préférence 2 à 3 semaines avant la mise-bas
TRIVACTON 6 (Boehringer Ingelheim)	+	+	+		Hydroxyde d'aluminium + saponine	SC	Une dose 1 à 2 mois avant la mise-bas, puis une dose dans les jours qui précèdent la mise-bas

Annexe 5 : Chronologie de l'étude



Prélèvement de sang



Vaccination

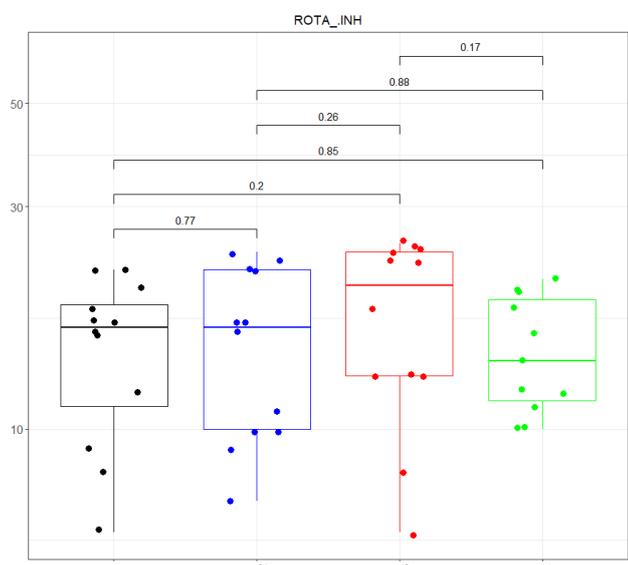


Prélèvement de colostrum

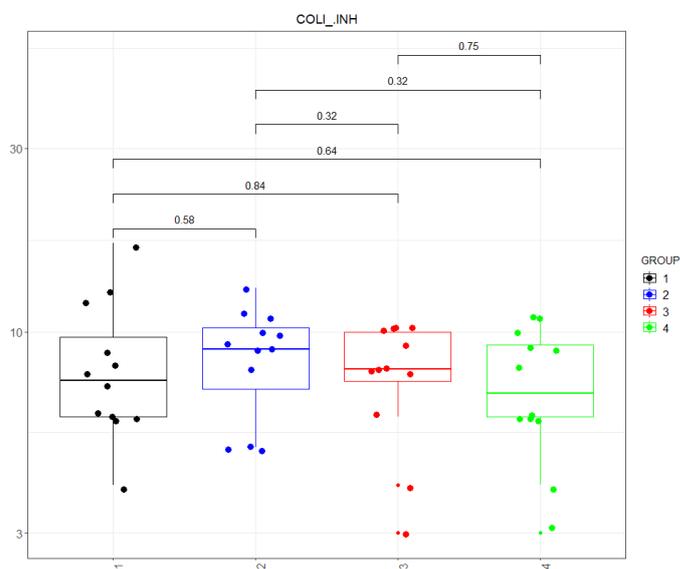


Randomisation : formation des lots

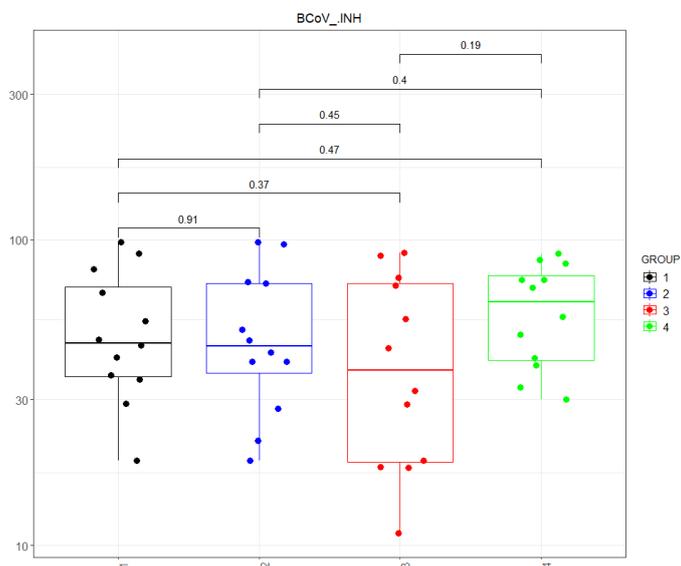
Annexe 6 : Analyses statistiques des résultats de sérologie utilisés pour la constitution des groupes de l'étude



1) Analyse statistique de la sérologie BRV

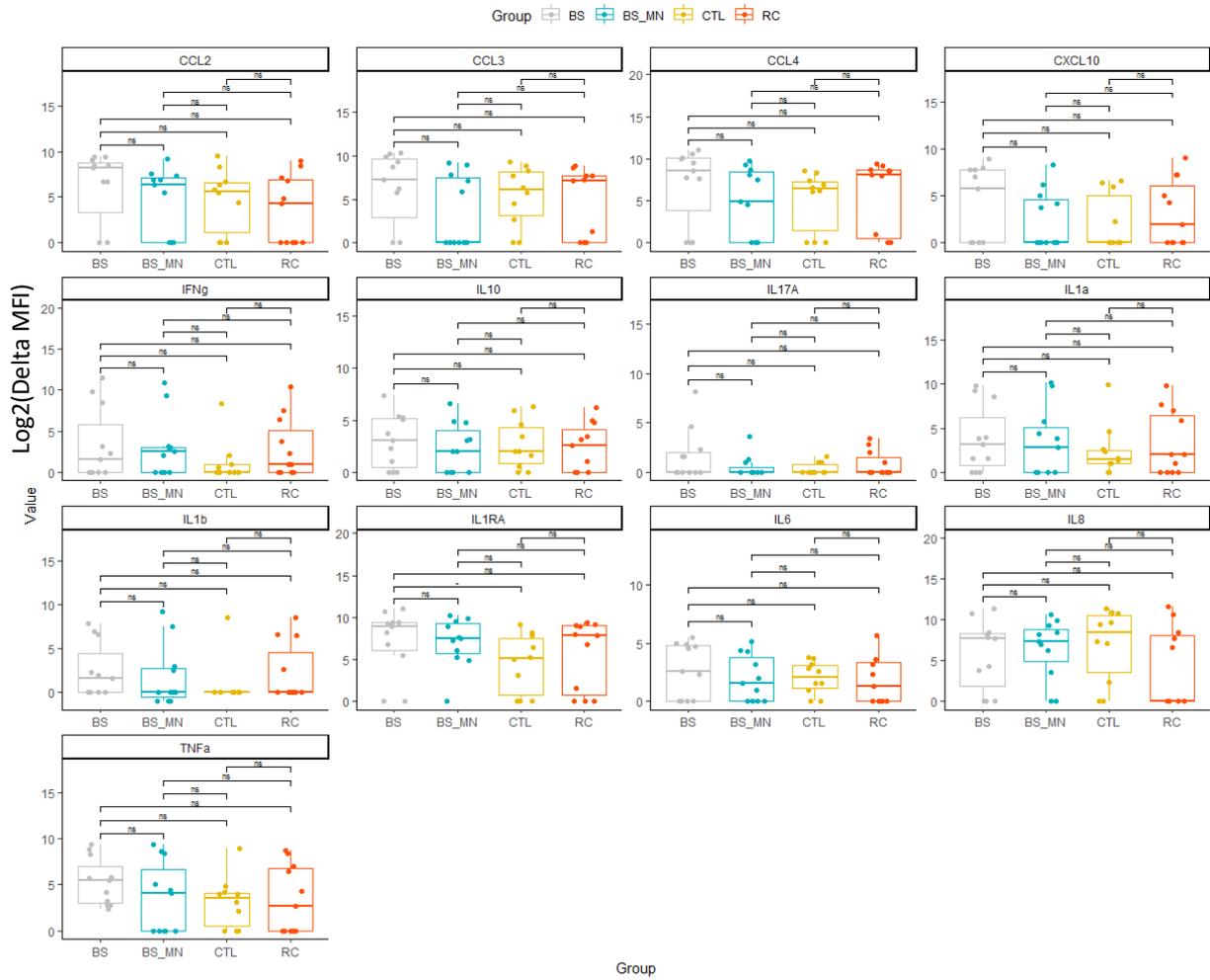


2) Analyse statistique de la sérologie *E. coli*



3) Analyse statistique de la sérologie BCoV

Annexe 7 : Réponse cellulaire à J28 avec le ligand BRV



MATHEY Bérénice Eléonore

Vaccination contre les entérites néonatales du veau : comparaison de la réponse induite par deux vaccins avec des adjuvants différents

Résumé :

Les entérites néonatales constituent une des dominantes pathologiques en élevage bovin. Le principal moyen médical de prévention est la vaccination des vaches gravides, qui permet une augmentation de l'immunité colostrale vis-à-vis des trois principaux agents responsables. Les adjuvants sont utilisés dans les vaccins pour orienter la réponse immunitaire vers le type humoral ou cellulaire et pour la renforcer.

Le but de cette étude expérimentale était de déterminer l'effet de l'adjuvant sur le profil de la réponse cellulaire chez la vache laitière. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un test innovant qui permet la description du profil de la réponse cellulaire spécifique des antigènes vaccinaux.

La réponse cellulaire induite par le vaccin est présente mais peu intense et ne permet pas la protection du veau. Les adjuvants choisis dans les vaccins contre les entérites néonatales doivent donc plutôt être promoteurs d'une réponse anticorps.

Mots clés : vaccins, entérites néonatales, veau, adjuvants, réponse immunitaire

Abstract:

Neonatal enteritis is one of the dominant pathologies in cattle breeding. The main medical means of prevention is the vaccination of pregnant cows, which allows an increase in colostrum immunity against the three main causative agents. Adjuvants are used in vaccines to guide the immune response towards the humoral or the cellular type and to reinforce it.

The objective of this experimental study was to determine the effect of the adjuvant on the profile of the cellular response in dairy cows. The analysis was carried out using an innovative test that allows the description of the profile of the specific cellular response to vaccine antigens.

The cellular response induced by the vaccine is present but not very intense and does not allow the protection of the calf. The adjuvants chosen in vaccines against neonatal enteritis should therefore rather promote an antibody response.

Key words: vaccines, neonatal enteritis, calf, adjuvants, immune response