



HAL
open science

Circulation du virus influenza D en élevage laitier : suivi longitudinal dans trois exploitations

Chloé Riviere

► **To cite this version:**

Chloé Riviere. Circulation du virus influenza D en élevage laitier : suivi longitudinal dans trois exploitations. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04251842

HAL Id: dumas-04251842

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04251842v1>

Submitted on 20 Oct 2023

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

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

ANNEE 2023

THESE : 2023 – TOU 3 – 4070

CIRCULATION DU VIRUS *INFLUENZA D* EN ELEVAGE LAITIER : SUIVI LONGITUDINAL DANS TROIS EXPLOITATIONS

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

RIVIERE Chloé, Marie

Directeur de thèse : **M. Gilles MEYER**

JURY

PRÉSIDENT :
M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Gilles MEYER
M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'École 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. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- 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*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

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. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
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**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **FUSADE-BOYER**, *Microbiologie et infectiologie*
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. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
Mme **WARET-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 **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
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 **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

À mon jury de thèse,

À Monsieur Jacques IZOPET

Professeur en virologie à la Faculté de Médecine de Toulouse et praticien hospitalier,

Qui a accepté de présider ce jury de thèse.

Remerciements sincères.

À Monsieur Gilles MEYER

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse en pathologie des ruminants

Mon directeur de thèse, pour m'avoir proposé ce sujet et m'avoir guidée pendant sa réalisation.

Mes sincères remerciement pour sa confiance et surtout sa patience.

À Monsieur Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse en virologie et maladies infectieuses

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

Remerciements sincères.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	17
-------------------	----

Partie I : Les agents pathogènes des bronchopneumonies infectieuses bovines : étude

bibliographique.....	19
----------------------	----

I. Les bronchopneumonies infectieuses chez les bovins (BPI) 19

1. Définition des BPI.....	19
2. Étiologie des BPI.....	20
a. Les agents infectieux.....	20
b. Facteurs liés à la conduite d'élevage et à l'environnement.....	21
c. Facteurs liés à l'hôte : anatomie et Immunité chez les bovins.....	21
3. Diagnostic.....	22
a. Le diagnostic direct.....	23
i. Prélèvements sur un animal vivant.....	24
ii. Prélèvements sur un animal mort.....	25
b. Le diagnostic indirect :.....	25

II. Les agents infectieux respiratoires 26

1. Les agents infectieux.....	26
2. La fréquence des agents pathogènes respiratoires.....	26
a. Les virus.....	26
b. Les bactéries.....	28
3. Le pouvoir pathogène des agents infectieux.....	30
a. Agents ayant un pouvoir pathogène fort.....	32
i. Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV).....	32
ii. Virus Parainfluenza de type 3 (BPI3).....	33
iii. Mycoplasmes : <i>Mycoplasma bovis</i>	34
iv. Pasteurelle : <i>Mannheimia haemolytica</i>	35
b. Agents ayant un pouvoir pathogène modéré.....	36
i. Virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR ou BoHV-1).....	36
ii. Coronavirus bovin (BCoV).....	37
iii. Adénovirus bovin de type 3 (BAV-3).....	38
iv. Virus de la diarrhée virale bovine (BVDV).....	38
v. Pasteurelle : <i>Pasteurella multocida</i>	39
vi. Pasteurelle : <i>Histophilus somni</i>	39
4. Les interactions entre agents pathogènes.....	40
a. Interactions entre virus et bactéries.....	41
b. Interactions entre virus.....	43
c. Interactions entre bactéries.....	44

III. Identification de nouveaux agents pathogènes respiratoires : Cas du virus Influenza D ou IDV 46

1. Identification de nouveaux virus par séquençage de nouvelle génération à haut débit (NGS) des génomes viraux.....	46
2. Nouveau virus : Virus Influenza D.....	48
a. Historique.....	48
b. Répartition géographique et origine du virus.....	50
c. Le spectre d'hôte.....	51
i. Les bovins.....	52
ii. Les porcs.....	53
iii. Les petits ruminants.....	53
iv. Les chevaux.....	54

v.	Les camélidés.....	54
vi.	La faune sauvage	55
vii.	L'humain	55
d.	Les propriétés générales du Virus Influenza D	57
i.	Propriétés structurales	57
ii.	Génome viral	57
iii.	Le cycle de réplication	60
3.	Pathogénicité IDV : ce que l'on sait pour l'instant	63
a.	La pathogénicité lors d'une infection par le virus Influenza D	63
b.	La pathogénicité lors d'une co-infection	65
i.	Co-infection entre IDV et les bactéries.....	65
ii.	Co-infection entre IDV et les autres virus.....	66
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.....		68
I.	Objectifs	68
II.	Matériel et Méthodes	69
1.	Échantillonnage.....	69
a.	Exploitations.....	69
b.	Fréquence des prélèvements	69
c.	Bovins prélevés.....	71
2.	Score clinique	72
3.	Réalisation des prélèvements	73
a.	Écouvillons nasaux profond.....	73
b.	Prélèvements sanguins.....	74
4.	Réalisation des analyses.....	75
a.	Analyses des écouvillons nasaux par q-PCR	75
i.	Extraction de l'ARN ou de l'ADN viral et bactérien.....	75
ii.	Amplification de l'ARN viral ou de l'ADN bactérien par q-PCR.....	76
b.	Analyse sérologique par IHA	80
i.	Principe du test IHA	80
ii.	Choix de la souche du virus	81
iii.	Étape de pré-traitement : traitement des sérums avec le produit « Cholera Filtrate »	81
iv.	Hémabsorption des sérums.....	82
v.	Dilution des sérums	82
vi.	Test d'inhibition de l'hémagglutination avec le virus	83
III.	Résultats.....	84
1.	Fréquence des agents pathogènes respiratoires et co-infections	84
a.	Fréquence de détection des différents agents pathogènes respiratoires.....	84
i.	Données globales pour les trois élevages laitiers étudiés	84
ii.	Fréquence de détection des agents pathogènes respiratoires dans l'exploitation E1	85
iii.	Fréquence de détection des agents pathogènes respiratoires dans l'exploitation E2	88
iv.	Fréquence de détection des agents pathogènes respiratoires dans l'exploitation E3	90
b.	Fréquence de détection des agents pathogènes selon le stade physiologique	92
c.	Co-infections à l'échelle de l'expérience	93
d.	Co-infection à l'échelle des exploitations en fonction du stade physiologique des bovins	94
2.	Signes cliniques	95
a.	Importance des signes cliniques lors de mono ou de poly infection chez les bovins.....	95
b.	Relations entre le score clinique et les agents pathogènes présents dans les voies respiratoires supérieures	98
3.	Fréquence d'identification et rôle pathogène du virus IDV	99
a.	Fréquence de détection d'IDV chez individus sains et malades.....	99
b.	Sérologie IDV sur les trois exploitations	99
i.	Vue globale des trois exploitations laitières	99
ii.	Séropositivités des bovins prélevés	101

IV. Discussion	103
1. Prévalence et association d'agents pathogènes dans les BPI dans les exploitations laitières	103
a. Prévalence des agents pathogènes dans les exploitations laitières.....	103
b. Les co-infections dans les exploitations laitières.....	106
2. Circulation de l'IDV dans les élevages laitiers	107
3. Perspectives de l'étude	111
V. Conclusion	113
VI. Bibliographie	115
Annexes	125

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : ARBRE PHYLOGENETIQUE REPRESENTANT LES TROIS CLADES D'IDV (ODAGIRI ET AL. 2018)	50
FIGURE 2 : CARTE DE LA CIRCULATION MONDIALE DE L'IDV (OLIVIA 2020)	50
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN VIRUS DE TYPE INFLUENZA D (HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG/).....	57
FIGURE 4 : GENOME DU VIRUS INFLUENZA D (HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG/)	58
FIGURE 5 : CYCLE DE VIE DES VIRUS INFLUENZA (KRAMMER ET AL. 2018).....	60
FIGURE 6 : DATES DE PRELEVEMENTS DES TROIS EXPLOITATIONS DE VACHES LAITIERES.....	70
FIGURE 7 : SCHEMA DE LA METHODE SYBR GREEN ET TAQMAN	77
FIGURE 8 : PRINCIPE DE L'INHIBITION PAR HEMAGGLUTINATION.....	83
FIGURE 9 : FREQUENCE DE DETECTION DES PRINCIPAUX AGENTS PATHOGENES RESPIRATOIRES DANS LES TROIS EXPLOITATIONS ETUDIEES	84
FIGURE 10 : FREQUENCE DES AGENTS PATHOGENES RESPIRATOIRES DANS CHAQUE EXPLOITATION, A LA DATE DES PRELEVEMENTS	85
FIGURE 11 : FREQUENCE DES AGENTS PATHOGENES RESPIRATOIRES POUR L'EXPLOITATION E1.....	86
FIGURE 12 : BOVINS PRESENTANT DES Q-PCR (EN Ct) POSITIVES DANS L'EXPLOITATION E1.....	87
FIGURE 13 : FREQUENCE DES AGENTS PATHOGENES RESPIRATOIRES POUR L'EXPLOITATION E2.....	88
FIGURE 14 : BOVINS PRESENTANT DES Q-PCR (EN Ct) POSITIVES DANS L'EXPLOITATION E2.....	89
FIGURE 15 : FREQUENCE DES AGENTS PATHOGENES RESPIRATOIRES POUR L'EXPLOITATION E3.....	90
FIGURE 16 : BOVINS PRESENTANT DES Q-PCR (EN Ct) POSITIVES DANS L'EXPLOITATION E3.....	91
FIGURE 17 : FREQUENCE DES AGENTS PATHOGENES RESPIRATOIRES EN FONCTION DU STADE PHYSIOLOGIQUE DES BOVINS	92
FIGURE 18 : POURCENTAGE DE CO-INFECTIONS A L'ECHELLE DES TROIS EXPLOITATIONS	94
FIGURE 19 : QUANTITE D'AGENTS PATHOGENES RESPIRATOIRES DANS LES VOIES AERIENNES SUPERIEURES EN FONCTION DU SCORE CLINIQUE DU BOVIN.....	97
FIGURE 20 : SIGNES CLINIQUES DES BOVINS EN FONCTION DU SCORE CLINIQUE OBTENU	98
FIGURE 21 : NOMBRE D'ANIMAUX EN FONCTION DU SCORE CLINIQUE DES BOVINS ET DE L'AGENT PATHOGENE OU DE L'ASSOCIATION D'AGENTS PATHOGENES RETROUVES DANS LES EN	99
FIGURE 22 : BOVINS PRESENTANT DES RESULTATS POSITIFS A IHA EN FONCTION DE SON STADE DE VIE ET DE SON EXPLOITATION	102

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : RESUME DES DIFFERENTS AGENTS PATHOGENES IMPLIQUES DANS LE BPI ET DE LEUR ROLE SUPPOSE DANS LEUR APPARITION (MARIA, 2022).....	31
TABLEAU 2 : RECAPITULATIF DE LA POPULATION DE BOVINS PRELEVES.....	72
TABLEAU 3 : GRILLE DE SCORE UTILISEE POUR ETABLIR LE SCORE CLINIQUE SI UN BOVIN PRESENTAIT DES SYMPTOMES RESPIRATOIRES	73
TABLEAU 4 : TABLEAU RECAPITULATIF DES AMORCES UTILISEES LORS DES Q-PCR	79
TABLEAU 5 : POURCENTAGE DE CO-INFECTIONS PAR EXPLOITATION EN FONCTION DU STADE PHYSIOLOGIQUE DES BOVINS.....	95
TABLEAU 6 : RESULTATS DES TESTS D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION POUR LES SOUCHES D/5920 POUR TOUS LES PRELEVEMENTS.....	101
TABLEAU 7 : SEROPREVALENCES APPARENTES ET REELLES (EN POURCENTAGES) ET INTERVALLES DE CONFIANCE ASSOCIES DES RESULTATS DES TESTS D'IHA POUR LA SOUCHE D/5920 (IC = INTERVALLE DE CONFIANCE) EN FONCTION DES EXPLOITATIONS ET DES DATES DE PRELEVEMENTS	101
TABLEAU 9: RESULTAT Q-PCR (EN Ct) DES EN DANS L'EXPLOITATION E1 ANNEE 1	128
TABLEAU 10 : RESULTAT Q-PCR (EN Ct) DES EN DANS L'EXPLOITATION E1 ANNEE 2	129
TABLEAU 11 : RESULTAT Q-PCR (EN Ct) DES EN DANS L'EXPLOITATION E2.....	131
TABLEAU 12 : RESULTAT Q-PCR (EN Ct) DES EN DANS L'EXPLOITATION E3.....	132

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : PROTOCOLE DU PROJET PREVENTER	125
ANNEXE 2 : CO-INFECTIONS EN FONCTION DU STADE PHYSIOLOGIQUE DES BOVINS DANS CHAQUE EXPLOITATION.....	127
ANNEXE 3 : RESULTATS DES TESTS D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION POUR LES SOUCHES D/5920 POUR TOUTES LES EXPLOITATIONS.....	133

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNc : ARN complémentaire

ARNm : ARN messenger

ARNv : ARN viral

ATT : aspiration trans-trachéale

BCoV : bovine coronavirus

BoHV-1: bovine herpes virus 1

BAV : bovine adenovirus

BPI : bronchopneumonie infectieuse

BPI3 : bovine parainfluenza virus type 3

BRSV : bovine respiratory syncytial virus

BVDV : bovine viral diarrhea virus

D/660 : D/bovine/Oklahoma/660/2013

D/France/2986 : D/bovine/France/2986/2012

D/Irlande/007780 : D/bovine/Irlande/007780/2014

D/OK ou C/OK : D/swine/Oklahoma/1334/2011

D/France/5920 ou D/5920 : D/bovine/France/5920/2014

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EN : écouvillon nasal

ENVT : école nationale vétérinaire de Toulouse

HA : hémagglutinine

HE : hémagglutinine estérase

HEF : hémagglutinine estérase fusion

HP : hautement pathogène

IAV : virus influenza A

IBV : virus influenza B

ICV : virus influenza C

ICAM-1 : inter cellular adhesion molecule-1

IDV : virus influenza D

Ig : immunoglobuline

IHA : inhibition de l'hémagglutination

IL-10 : interleukine 10
IL-12 : interleukine 12
IL-17 : interleukine 17
IFN γ : interferon gamma
LB : lymphocyte B
LBA : lavage bronchoalvéolaire
LKT : leucotoxine
LT : lymphocyte T
M1 : protéine de matrice 1
M2 : protéine de matrice 2
MERS : middle east respiratory syndrome
MMP-1 : matrix metalloproteinase-1
MMP-3 : matrix metalloproteinase-3
NGS : séquençage à haut débit
NLS : nuclear localization signal sequence
NP : nucléoprotéine
NS1 et 2 : protéine non structurale 1 et 2
PA : polymérase acide
PAMP : pathogen associated molecular pattern
PB1 : polymérase basique 1
PB2 : polymérase basique 2
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : polymerase chain reaction
pH : potentiel hydrogène
q-PCR : PCR quantitative
RDE : Receptor Destroying Enzyme
RT-PCRq : reverse transcriptase PCR quantitative
SARS : severe acute respiratory syndrome
TNF α : tumor necrosis factor α ou facteur de nécrose tumorale α
UHA : unité hémagglutination

INTRODUCTION

La bronchopneumonie infectieuse (BPI) est un terme général désignant des troubles de l'appareil respiratoire profond pouvant affecter des bovins. La BPI est considérée comme la deuxième maladie la plus dévastatrice chez les jeunes bovins avec des pertes économiques et des enjeux sanitaires importants. Très présente lorsque la densité d'animaux est forte, cette pathologie est multifactorielle. Elle associe à la fois la présence d'un ou de plusieurs agents pathogènes viraux ou bactériens et des facteurs de risques liés aux individus et à l'environnement. En industrie laitière, cette pathologie est moins fréquente mais son impact sur les bovins n'est pas négligeable. En effet, les BPI entraînent des coûts élevés associés aux traitements, des retards de croissance sur les veaux, des pertes en production de lait, des taux de morbidité et de mortalité parfois élevés dans les élevages.

Cette maladie étant déjà reconnue comme polymicrobienne, de nombreuses études ont pour objectif d'identifier et d'étudier les différents agents pathogènes impliqués dans son apparition. Au siècle dernier, les principaux agents infectieux responsables des BPI ont été identifiés. *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* et *Mycoplasma bovis* sont les bactéries les plus souvent retrouvées dans les prélèvements de bovins atteints de troubles respiratoires. Le virus respiratoire syncytial bovin, le virus parainfluenza bovin de type 3, le coronavirus bovin, le virus de rhinotrachéite infectieuse bovine, l'adénovirus de type 3 et le virus de la diarrhée virale bovine sont les virus responsables de BPI.

Toutefois, de nouveaux agents pathogènes ont été récemment identifiés grâce à de nouvelles technologies de séquençage de masse. Récemment, le virus Influenza D a été découvert sur des porcs présentant des troubles respiratoires. Après quelques études, ce virus a été également retrouvé sur les prélèvements de bovins présentant des BPI.

Le but de notre étude est d'évaluer la fréquence d'apparition des principaux virus déjà connus lors de troubles respiratoires dans plusieurs élevages laitiers sur une période de deux années consécutives. Nous allons ainsi étudier les effets cliniques chez les bovins, en fonction du ou des agents pathogènes retrouvés dans leurs voies respiratoires supérieures. Le second objectif est d'étudier la fréquence d'apparition du virus Influenza D et ainsi connaître sa circulation au sein des élevages.

Partie I : Les agents pathogènes des bronchopneumonies infectieuses bovines : étude bibliographique

I. Les bronchopneumonies infectieuses chez les bovins (BPI)

1. Définition des BPI

Le complexe des bronchopneumonies infectieuses (BPI) est, sur le terrain, un terme général désignant des troubles respiratoires pouvant affecter les voies respiratoires profondes des bovins. Elles se définissent comme des affections inflammatoires de l'appareil respiratoire profond, d'allure contagieuse et d'étiologie plurifactorielle incluant des agents infectieux relayés par des facteurs liés à la conduite d'élevage et à l'environnement.

De par son caractère très contagieux, c'est l'une des maladies les plus coûteuses et les plus fréquemment diagnostiquées dans l'industrie bovine, plus particulièrement chez les veaux et les jeunes bovins. Chez les veaux les BPI représentent la deuxième cause de morbidité/mortalité après les diarrhées néonatales (1). Les impacts économique et sanitaire dus à cette affection sont considérables pour les éleveurs (2).

Cliniquement, cette affection se traduit, tout d'abord, par l'apparition d'hyperthermie. Ce premier signe est présent bien avant les autres signes cliniques généraux ou l'atteinte des voies respiratoires. En moyenne, 20 heures après le début de l'hyperthermie, il y a l'apparition d'écoulements nasaux, de jetage séro-muqueux, d'une toux forte et sèche avec la présence de tachypnée et de dyspnée fréquemment. Environ 50 heures après la présence d'hyperthermie, le bovin présente une baisse de l'état général avec de l'abattement et une perte d'appétit plus ou moins marquée (3).

La grande majorité des animaux touchés par les BPI sont les jeunes bovins. En effet, la fréquence d'apparition de la maladie est plus élevée chez les jeunes veaux dans des élevages naisseurs, ou chez des bovins plus âgés en ateliers d'engraissement suite à l'allotissement d'animaux provenant de différentes exploitations.

Les génisses laitières sont aussi touchées durant leurs premières années de vie.

Dans un élevage, la BPI peut prendre toutes les formes épidémiologiques, selon la nature des agents infectieux et les conditions d'élevage. Le plus souvent, la maladie

débutent par une phase épizootique avec une morbidité et une mortalité plus ou moins élevées. En fonction du changement de la conduite d'élevage ou non, la maladie peut prendre différentes allures.

Si l'éleveur modifie les facteurs favorisant l'émergence de la maladie, celle-ci peut prendre un aspect sporadique avec l'apparition de très rares cas.

Cependant, si l'éleveur ne prend pas en charge rapidement le problème, l'épidémie peut s'aggraver entraînant une augmentation de la mortalité dans son élevage. La forme enzootique de la maladie peut également s'installer, entraînant une faible morbidité et mortalité dans l'élevage.

2. Étiologie des BPI

L'étiologie des BPI est généralement multifactorielle, faisant intervenir des agents infectieux et de plusieurs facteurs favorisant et prédisposant à la pneumonie.

a. Les agents infectieux

Fréquemment, la maladie se traduit par la présence de multiples agents infectieux seuls ou en co-infection dans les voies respiratoires. Parmi ces agents, les bactéries et virus sont les plus fréquemment identifiés, parfois des parasites peuvent être retrouvés dans les prélèvements de BPI (4).

De nombreux virus tels que le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV), le virus parainfluenza bovin de type 3 (BPI3), l'herpès virus bovin de type 1 (BoHV-1) ou des coronavirus (BCoV) et des adénovirus bovins (BAV) peuvent être impliqués dans ces infections. Ces virus peuvent directement entraîner une pathologie respiratoire et/ou affaiblir le système immunitaire et favoriser les infections bactériennes secondaires. Parmi les bactéries, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* et *Mycoplasma bovis* sont les bactéries les plus couramment détectées lors des analyses de prélèvements des bronchopneumonies bovines. Certaines, comme *M. haemolytica*, sont capables de causer des infections pulmonaires aiguës et sévères.

De ce fait, la présence de ces agents infectieux dans les bronchopneumonies bovines souligne l'importance d'une gestion appropriée des troupeaux, notamment en matière

de vaccination, de biosécurité ou de gestion du stress, afin de réduire l'exposition ou la surinfection des jeunes bovins.

b. Facteurs liés à la conduite d'élevage et à l'environnement

La conduite d'élevage est un facteur très important dans le déclenchement ou la propagation de la maladie. En effet, une densité trop importante d'animaux dans les bâtiments générant du stress, des vêlages groupés, une alimentation non adaptée entraîne une augmentation de la transmission des agents pathogènes et de la sensibilité des animaux.

De même, le mélange des jeunes veaux lors de l'allotissement, ayant une protection immunitaire plus faible, avec les adultes, provoque de fortes épidémies dans les troupeaux (5).

L'environnement est également un point clé dans la propagation de la maladie dans les stabulations. La mauvaise qualité de l'air, une ventilation ou une humidité trop importante, une mauvaise régulation de la température sont des facteurs prédisposants aux BPI. (6)

Effectivement, le système immunitaire des jeunes bovins est particulièrement sensible au froid. L'humidité et les courants d'air, quant à eux, sont largement influencés par les systèmes d'aération des bâtiments, notamment la ventilation. Il est essentiel de trouver un équilibre adéquat entre une ventilation efficace et l'absence de courants d'air, afin de favoriser la circulation de l'air sans propager les agents pathogènes.

La ventilation joue également un rôle crucial dans la régulation de la concentration d'ammoniac dans le bâtiment, contribuant ainsi à maintenir un environnement sain pour les bovins (7).

c. Facteurs liés à l'hôte : anatomie et Immunité chez les bovins

Les bovins sont anatomiquement handicapés de par leur système respiratoire. En effet, les poumons des bovins sont fortement compartimentés. L'absence de ventilation collatérale inter alvéolaire et inter bronchiolaire, et la faible surface des échanges gazeux demandent aux bovins beaucoup d'énergie et limitent leur capacité respiratoire.

Par conséquent, les bovins, contrairement à d'autres mammifères, utilisent constamment une proportion importante de leur parenchyme pulmonaire, pour répondre à leurs besoins en oxygène, ce qui accroît leur exposition aux contaminants atmosphériques, aux substances allergènes et aux substances nuisibles.

De plus, en cas de lésion pulmonaire, l'absence de ventilation collatérale condamne toute la zone pulmonaire située en aval de la lésion. Dans le cas de bronchopneumonie infectieuse, maintenir une fonction respiratoire adéquate nécessite une consommation énergétique accrue, même si la capacité respiratoire est déjà limitée. Cela entraîne une augmentation des mouvements ventilatoires, exposant et irritant davantage le tissu pulmonaire, ce qui favorise la contamination par des agents infectieux (8).

Parmi les bovins, le veau est le plus vulnérable face à cette maladie en raison de son système immunitaire. À sa naissance, le veau est dit immunocompétent mais son système immunitaire n'est pas encore totalement opérationnel. Les veaux atteignent une maturité immunitaire vers l'âge de 4-5 mois (9). Lors d'une étude, il a été démontré que le pic d'apparition de la pneumonie se produisait entre 2 et 4 semaines d'âge chez les bovins ; lorsque les concentrations sériques d'IgG1, d'IgG2 et d'IgA des veaux étaient les plus faibles (10). C'est pourquoi l'immunité passive acquise par le colostrum est indispensable pour protéger les veaux contre les maladies.

Ces observations peuvent expliquer en partie, la grande sensibilité de certains jeunes animaux.

3. Diagnostic

Le diagnostic, uniquement basé sur la symptomatologie, est parfois difficile. En effet, les troubles respiratoires sont généralement peu spécifiques. Seul l'examen en laboratoire peut confirmer l'agent pathogène responsable de la maladie dans un élevage.

Toutefois, chaque résultat obtenu doit être interprété en tenant compte de plusieurs paramètres. L'âge de l'animal est essentiel car si le veau est trop jeune, les anticorps sériques d'origine maternelle peuvent gêner le diagnostic sérologique. Le site, les conditions et la qualité des prélèvements jouent aussi un rôle très important dans

l'interprétation des résultats. Certains virus comme le BRSV sont fragiles et instables en milieu extérieur ; une conservation au froid est indispensable pour sa fiabilité.

La sensibilité de la technique est importante. Un délai court entre le début des signes cliniques (ou la mort), et la réalisation des prélèvements est indispensable.

Les techniques les plus utilisées en médecine vétérinaire sont la détection d'antigènes viraux ou de l'ARN/l'ADN viral chez les animaux vivants ; et la détection par immunomarquage sur coupes de poumons de bovins morts.

a. Le diagnostic direct

Le diagnostic direct a pour objectif de détecter des virus ou des bactéries par leur présence, leurs antigènes ou leur génome (ARN ou ADN). Plusieurs méthodes sont couramment utilisées telles que les examens microscopiques, la réaction de polymérisation en chaîne, l'immunofluorescence ou les examens histopathologiques des échantillons.

La présence de bactéries, de cellules inflammatoires ou d'autres indicateurs d'infections peuvent être facilement observés lors d'examens microscopiques des échantillons. De même, les cultures bactériennes peuvent être accomplies dans le laboratoire, afin d'isoler et d'identifier les bactéries responsables des signes cliniques sur le bovin.

Les techniques de réplique ciblée in vitro sont aussi appelés les réactions en chaîne par polymérase (PCR) ou les q-PCR lorsqu'elles sont quantitatives. Ces méthodes de biologie moléculaire amplifient une partie du matériel génétique de l'agent recherché. On obtient ainsi la détection rapide et spécifique de l'agent pathogène, même s'il est présent en faible quantité.

L'immunofluorescence est un autre procédé, utilisé pour rechercher les antigènes spécifiques des agents infectieux présents dans les échantillons.

Pour finir, l'examen histopathologique de biopsies pulmonaires peut révéler des lésions caractéristiques de la bronchopneumonie bovine, telles que l'inflammation, l'œdème et l'infiltration de cellules inflammatoires.

Ces méthodes de diagnostic direct sont essentielles afin d'identifier les agents pathogènes responsables de la BPI. Ces constats peuvent être faits sur animal vivant ou mort.

i. Prélèvements sur un animal vivant

Il existe différentes techniques de prélèvement pour détecter le virus ou les bactéries : l'écouvillonnage nasal (EN), l'aspiration trans-trachéale (ATT) et le lavage bronchoalvéolaire (LBA). Le choix du prélèvement se fait généralement en fonction des moyens mis à disposition. En effet, il semble que les prélèvements issus du tractus respiratoire profond soient plus riches en matériel cellulaire et plus représentatifs des BPI. Toutefois, sur le terrain, il peut être parfois difficile de procéder à un LBA, si celui-ci est réalisé par endoscopie sous anesthésie générale (11).

S'il y a une bonne contention, l'écouvillonnage nasal permet de gagner du temps. En effet, il est simple et rapide et ne traumatise généralement pas l'animal. Il est souvent représentatif, en cas d'infection virale, des premières voies respiratoires (12). D'un autre côté, le risque de contamination par la flore bactérienne commensale, avec cette méthode, n'est pas négligeable.

Lors de symptômes pulmonaires, l'ATT est bien indiquée, notamment pour la recherche de bactéries de l'appareil respiratoire profond. En effet, ce prélèvement invasif permet d'obtenir davantage de liquide extracellulaire et ainsi plus d'informations, sur les agents pathogènes, que dans les EN (12).

Afin de préserver au maximum l'intégrité des échantillons, la conservation à des températures froides permet de ralentir la dégradation des composants biologiques. Le froid préserve leur structure et évite les altérations pouvant survenir à des températures ambiantes ou élevées.

De plus, le transport frigorifique permet de limiter le risque de contamination croisée avec d'autres agents pathogènes présents dans l'environnement. Cela garantit la véracité des résultats.

L'utilisation d'une fiche de commémoratifs pour chaque bovin prélevé est nécessaire. Elle rassemble toutes les données administratives (nom de l'éleveur, identification de l'animal, âge) et les données cliniques, indispensables à la réalisation d'un diagnostic

précis (site de prélèvement, symptômes, durée de l'évolution, antécédents, traitements déjà reçus...).

ii. Prélèvements sur un animal mort

Il est important de procéder à l'autopsie rapidement après la mort de l'animal, afin que les agents pathogènes ne se dégradent pas. Il est préférable de faire des prélèvements sur les lobes cranio-ventraux des poumons car les régions les plus caudales sont pauvres en antigènes viraux (13). La mise en évidence des antigènes viraux peut se faire par des techniques de PCR ou d'immunofluorescence sur coupes de poumon frais ou congelé. L'examen histologique permet également de visualiser des lésions de bronchiolite interstitielle d'origine virale.

Pour la recherche de bactéries, il est possible de procéder soit par la recherche d'antigènes, soit par des isolements.

b. Le diagnostic indirect :

Un diagnostic indirect est mis en évidence par la présence d'anticorps contre un agent pathogène sur un individu. En effet, une infection laisse toujours la trace repérable d'une réponse immunitaire sous forme d'anticorps spécifiques. Une analyse sérologique permet ainsi de détecter une infection récente ou ancienne en fonction des taux d'anticorps retrouvés dans l'analyse.

Le diagnostic sérologique nécessite au moins deux prélèvements, sur tube sec, afin de suivre une séroconversion ou une augmentation significative du titre en anticorps envers un agent pathogène. Différentes techniques sont disponibles mais la plus connue est le test ELISA.

Cependant, il est important de faire attention aux interférences avec les anticorps colostraux si le veau à moins de quatre mois, car ils peuvent gêner le diagnostic sérologique (14).

II. Les agents infectieux respiratoires

1. Les agents infectieux

Bien que plusieurs facteurs de risques liés à l'environnement, à la gestion de l'élevage ou à l'individu soient présents, les agents pathogènes sont les principaux responsables des signes cliniques observés chez les bovins atteints de bronchopneumonie infectieuse. De nombreux agents pathogènes ont déjà été identifiés comme étant à l'origine de cette affection, qu'ils soient présents seuls ou en association. En effet, pour seulement un tiers des cas, la maladie est causée par un seul agent pathogène. Pour les deux tiers des cas restants, il est fréquent de trouver une synergie entre virus et bactéries, ou entre virus, ou même entre bactéries (15).

Ces agents pathogènes sont souvent classés en tant que majeurs (avec un pouvoir pathogène avéré via des études expérimentales et ayant une fréquence élevée), ou mineurs (avec un pouvoir pathogène modéré selon les études expérimentales).

Les cinq virus les plus couramment identifiés lors de BPI et donc les plus étudiés sont : le BRSV (pour bovine respiratory syncytial virus, ancienne taxonomie) ou Bovine Orthopneumovirus (nouvelle taxonomie), le BPI3 (pour Bovine Parainfluenza 3 Virus, ancienne taxonomie) ou Bovine Respirovirus 3 (nouvelle taxonomie), le BoHV-1 (pour Bovine herpesvirus type 1) le BCoV (pour Bovine coronavirus) et le BAV-3 (pour Bovine Adenovirus 3) (16).

Les quatre bactéries sont : *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* et *Mycoplasma bovis* (17).

Toutefois, les recherches récentes sur la BPI ont permis d'identifier d'autres agents pathogènes potentiellement responsables de la maladie, que ce soit individuellement ou en association avec d'autres agents infectieux.

2. La fréquence des agents pathogènes respiratoires

a. Les virus

Globalement les infections respiratoires dues aux virus sont plus fréquentes chez les jeunes bovins, notamment pour le BRSV et le BPI3.

En effet, en France, la séroprévalence du BRSV est supérieure à 60 %, sachant que 50% des animaux sont primo-infectés avant l'âge de 12 mois (18). Le BRSV tient une place très importante au sein du complexe des affections respiratoires. Il est démontré que sa présence pourrait favoriser les contaminations bactériennes secondaires des voies respiratoires (19). De nombreuses enquêtes épidémiologiques menées en Suède, au Danemark et en Italie sur des élevages laitiers ont montré que 60 à 70 % des troubles respiratoires étaient liés au BRSV (20), et au moins une vache était séropositive au BRSV dans tous les élevages étudiés. Dans 25% de ces élevages, tous les bovins étaient testés positifs (21).

Tout comme le BRSV, le BPI3 est fréquemment responsable des troubles respiratoires chez les jeunes bovins, plus particulièrement en Amérique du Nord. Toutefois, le BPI3 a une séroprévalence estimée à 50% dans les troupeaux en Europe (22). En Norvège, en 2009, il a été estimé que la prévalence de ce virus sur les veaux de plus de 5 mois dans les élevages laitiers était de 50,2% (23).

L'infection IBR est connue depuis plus d'un siècle. Entre les années 1960 et 1990, la séropositivité des bovins face à l'IBR n'a fait qu'augmenter. En 1986, près de 35% des bovins et 48% des troupeaux présentaient des anticorps contre l'IBR. Un plan de lutte nationale a été initié au début des années 2000 et fortement implémenté ces dix dernières années. Dans les derniers rapports de l'Anses, la situation au 30 juin 2021 montre une prévalence nationale française moyenne de cheptels infectés par l'IBR qui avoisine les 2,04%, avec une prévalence plus importante en allaitant qu'en laitier. Toutefois, il existe des variations importantes entre les départements. La prévalence des ateliers infectés varie de 0% à 39% avec une médiane de 1,2% (24).

Depuis quelques années, de nouveaux virus sont incriminés dans les pathologies respiratoires. Les coronavirus et les adénovirus sont de plus en plus étudiés. Généralement associé à des maladies entériques, le BCoV a été découvert en 1972 (25), mais ce n'est que 10 ans après, en 1982, que celui-ci a été isolé pour la première fois par Thomas *et al.* sur les poumons de veaux souffrant de BPI (26).

Sa prévalence en élevage varie très souvent parallèlement avec les virus cités précédemment.

Par exemple, une étude datant de 2010, montre que sur 2 763 animaux répartis dans 2 137 élevages suédois, la présence d'anticorps contre BCoV varie généralement de la même manière, que la présence d'anticorps contre le BRSV. Effectivement, lorsque la prévalence d'un des deux virus dans une zone était élevée, la prévalence de l'autre virus était aussi élevée, entre 65% et 73%. Si la zone, présentait des prévalences plus faibles pour le BCoV, la prévalence diminuait aussi pour BRSV (27).

D'autres études plus récentes, démontrent la synergie entre les infections BRSV, BPI3, BCoV et le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV). En 2006, Hägglund *et al.* ont étudié sur un an, des veaux âgés de 7 à 15 mois de 118 troupeaux laitiers différents. Les résultats indiquent qu'au moins 74 % des veaux ont subi une ou plusieurs infections par les virus : 30%, 48%, 34% et 8% des veaux étaient séropositifs pour le BRSV, le BPI3, le BCoV et le BVDV.

Cette étude a montré une charge d'infection élevée chez les jeunes animaux et une propagation très efficace du BRSV, du BPI3 et du BCoV (28).

Pour finir, la prévalence des adénovirus est très peu connue dans les BPI. Isolé pour la première fois en 1965 lors de conjonctivite d'une vache saine, son implication dans les pathologies respiratoires bovines reste assez floue. En effet, il est fréquent de retrouver les adénovirus bovins (BAV) sur des bovins sains en bonne santé (29), et la majorité des infections liées au BAV est subclinique. Même si le virus est de plus en plus étudié, sa prévalence reste, encore aujourd'hui, assez méconnue (30). Une étude chinoise datant de 2020 a travaillé durant 2 ans dans 11 fermes de cinq villes. Sur ces 11 fermes, 108 échantillons ont été prélevés sur des bovins atteints de BPI. 78,7 % (85/108) des échantillons ont été détectés positifs au BAV-3 par PCR (31). La détection sérologique a révélé des taux positifs d'anticorps BAV-3 chez les bovins en Iran, en Finlande, en Belgique, en Pologne et en Turquie, variant entre 46,7 et 92,3 %. Ceci indique que ce virus est très largement répandu dans le monde actuellement (32–34).

b. Les bactéries

Les quatre bactéries majoritairement retrouvées dans les prélèvements de troubles respiratoires sont *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* et *Histophilus somni*.

Mannheimia haemolytica, *Pasteurella multocida* et *Histophilus somni* appartiennent à la famille des Pasteurellaceae.

M. haemolytica et *P. multocida* sont les principales bactéries isolées en France lors de pathologies respiratoires chez les bovins. En effet, une étude réalisée en 2013 par l'INRA, a consisté à faire un suivi régulier de 112 jeunes bovins nouvellement arrivés dans 3 ateliers d'engraissement. Cette recherche a permis de mettre en évidence seize épisodes de BPI qui sont apparus naturellement suite à la mise en lot. *M. haemolytica* a été, de loin, la bactérie la plus fréquemment isolée. Au total, 175 isolats ont été mis en évidence pendant quatorze de ces épisodes (35).

Une autre étude réalisée en 2002 en Belgique, a montré que, sur 80 lavages trachéaux de 80 veaux non traités et présentant des troubles respiratoires, 35 (soit 44%) des échantillons étaient bactériologiquement positifs. L'identification des souches a abouti principalement à la présence de *Pasteurella multocida* (68%). Les autres bactéries étaient *Mannheimia haemolytica* (15%), *Mycoplasma bovis* (11%), *Histophilus somni* (3 %) et des streptocoques α -hémolytiques (3%) (36).

Histophilus somni reste peu étudiée en comparaison avec les autres bactéries. Elle a surtout été mise en évidence en Amérique du Nord. En effet, une étude en Ontario a retrouvé *H. somni* dans 14% des poumons présentant des lésions pulmonaires. La présence de cette bactérie était, dans plus de 50% des cas, associée avec *P. multocida* et/ou *M. haemolytica* (37).

Selon le type de prélèvements réalisés lors de ces études (EN, l'ATT ou le LBA) il peut être parfois difficile de déterminer si ces bactéries sont la cause de la maladie. Notamment, il a été prouvé que ces agents pathogènes sont également présents dans le nasopharynx en tant que bactéries commensales (38), ce qui limite l'interprétation des tests réalisés à partir d'EN. Toutefois, lors d'une baisse immunitaire ou d'un changement propice à une infection, celles-ci peuvent devenir pathogènes.

Concernant les mycoplasmes, un réseau d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses chez les ruminants (VIGIMYC) a été mis en place en 2003 par l'Anses en France. Il permet d'identifier les espèces et sous-espèces de mycoplasmes chez les ruminants, de suivre leurs évolutions sur l'ensemble du territoire national afin de détecter s'il y a

de nouvelles émergences et de surveiller l'évolution de la sensibilité des mycoplasmes face aux antibiotiques.

Le rapport du VIGIMYC de 2021 a montré une situation épidémiologique similaire aux années précédentes avec près de la moitié des espèces identifiées correspondant à *M. bovis* (49,7%). Les échantillons positifs pour *M. bovis* étaient essentiellement d'origine respiratoire (86%) (39). Les autres expressions cliniques de cette bactérie étaient des arthrites, des mammites et des otites mais qui restaient sporadiques sur notre territoire, contrairement à d'autres pays européens.

Il est aussi important de souligner que dans la grande majorité des recherches permettant d'identifier les agents pathogènes responsables des BPI, *M. bovis* est fréquemment associée à d'autres agents infectieux comme le BRSV, le BPI3 ou des pasteurelles. En 2002, une étude belge a montré que dans 14% des échantillons positifs, plus d'un agent pathogène a été isolé. Dans la grande majorité des cas de poly-infection, *Mycoplasma bovis* était impliquée (36).

Les pneumonies à *M. bovis* se rencontrent majoritairement dans les élevages en lots (jeunes bovins et veaux de boucherie), où les animaux proviennent de cheptels différents. Ainsi, une association de plusieurs populations amène le mélange des différents agents pathogènes et favorise leur prolifération.

3. Le pouvoir pathogène des agents infectieux

Le pouvoir pathogène d'un agent infectieux peut varier considérablement. Certains présentent un pouvoir pathogène fort tandis que d'autres ont un pouvoir pathogène modéré ; certains sont présents naturellement dans le système respiratoire et d'autres ont été détectés dans les voies respiratoires d'animaux malades, mais leur rôle dans la BPI est encore inconnu (Tableau 1).

Un pouvoir pathogène fort se caractérise par la capacité d'un agent infectieux à provoquer des maladies graves, quelquefois mortelles, souvent avec des signes cliniques sévères. Ces agents pathogènes peuvent causer des épizooties ou des enzooties et nécessitent une intervention médicale et des mesures de prévention rigoureuses pour les contrôler et les contenir. Le BRSV, *M. haemolytica* et *M. bovis* ont par exemple, des pouvoirs pathogènes forts avec des conséquences graves sur les bovins.

En revanche, les agents infectieux ayant un pouvoir pathogène modéré ont tendance à provoquer des maladies moins sévères, avec des symptômes plus légers et/ou une progression plus lente. Bien que ces agents puissent encore causer des infections et entraîner des problèmes de santé, ils sont généralement moins graves et moins susceptibles de provoquer des épidémies importantes. Par exemple, le BCoV, le BoHV-1 ou *Pasteurella multocida* sont considérés comme des agents pathogènes à pouvoir modéré.

Toutefois, il est important de noter que la gravité d'une maladie infectieuse dépend de nombreux facteurs, tels que la virulence de l'agent pathogène, l'état de santé de l'individu infecté, et la capacité des systèmes de santé à répondre à l'épidémie. Nous allons étudier ici les différents agents infectieux en fonction de leur pouvoir pathogène.

Tableau 1 : Résumé des différents agents pathogènes impliqués dans le BPI et de leur rôle supposé dans leur apparition (Maria, 2022)

Catégories	Agents Pathogènes
Agents pathogènes ayant un tropisme respiratoire connu	BRSV BoHV-1 BPI3 IDV <i>M. bovis</i>
Bactéries commensales qui peuvent devenir opportunistes dans les voies respiratoires inférieures et provoquer une pneumonie.	<i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Histophilus somni</i> <i>Pasteurella multocida</i>
Agents pathogènes ayant un tropisme respiratoire non exclusif mais ayant des conséquences connues sur la pathologie respiratoire après l'infection	BCoV BVDV BAV
Pathogènes détectés dans les voies respiratoires des animaux malades, mais dont le rôle dans la BPI est inconnu	Bovine Astrovirus ICV Bovine rhinitis virus Ungulate bocaparvovirus 1

a. Agents ayant un pouvoir pathogène fort

i. Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV)

Le BRSV est un agent pathogène respiratoire majeur chez les bovins. Il appartient à la famille des *Pneumoviridae*, genre *Orthopneumovirus*. C'est un virus enveloppé à ARN simple brin.

Lors d'infection expérimentale par le BRSV sur des veaux naïfs allant de la naissance jusqu'à 6 mois, les BPI sont souvent modérées à sévères, cette variation dépendant du mode d'inoculation, et de la souche virale utilisée. Il est important de noter que ce virus est très largement répandu au sein de l'espèce bovine et la grande majorité des bovins adultes sont séropositifs après 12 mois de vie.

Même si le taux de morbidité du virus est élevé avec des valeurs allant de 20 à 50%, le taux de mortalité reste faible, 0,5-1%. Toutefois, dans certains cas, le virus peut atteindre un taux de mortalité plus élevé jusqu'à 20%, ce qui est important pour un élevage (40).

Lors d'une infection, sa période d'incubation est estimée entre 2 et 5 jours. Il est possible que celle-ci soit subclinique, avec aucun symptôme apparent sur la population. L'infection peut se limiter aux voies aériennes supérieures ou bien, affecter à la fois les voies aériennes supérieures et les voies respiratoires plus profondes.

En effet, grâce à sa glycoprotéine F, le virus peut fusionner et s'attacher aux cellules épithéliales des bronchioles puis aux cellules des alvéoles pulmonaires. Le BRSV exerce son effet pathogène en induisant une bronchiolite obstructive fonctionnelle puis restrictive (41).

Chez les jeunes, la réaction immunitaire est plus marquée car elle met en jeu une réponse cellulaire inflammatoire intense, caractérisée par la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires spécifiques. Cela entraîne des signes cliniques plus sévères tels que des fièvres élevées et des dyspnées abdominales avec des tachypnées sévères. Lors de réaction immunitaire exacerbée, des syndromes de détresse respiratoire peuvent apparaître (avec des veaux allongés, bouche ouverte, en orthopnée et dyspnée sévère).

En revanche, chez les animaux plus âgés, les signes cliniques de la maladie, tels que la bronchiolite obstructive, sont souvent moins graves en comparaison à ceux observés chez les jeunes (42).

Le virus est détectable au niveau pulmonaire à partir de 2 à 3 jours post-infection et jusqu'à 15 jours par RT-qPCR (PCR quantitative en temps réel). En plus d'être responsable des signes cliniques observés, il favorise très fréquemment l'apparition de surinfections bactériennes secondaires (40).

ii. **Virus Parainfluenza de type 3 (BPI3)**

Le BPI3 (nouvellement nommé bovine respirovirus 3) appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, genre *Respirovirus*. Il s'agit d'un gros virus ARN simple brin enveloppé.

Au cours des années 1990, le virus BPI3 a été beaucoup étudié. Cependant, depuis les années 2000, il a fait l'objet de recherches limitées. Les recherches actuelles sont principalement axées sur sa variabilité génétique et la possibilité de contamination croisée avec d'autres virus parainfluenza.

Concernant son mode de contamination, le BPI3 est capable d'infecter de nombreux types de cellules présentes dans l'appareil respiratoire. En effet, il est capable de se lier à l'acide sialique des cellules respiratoires provoquant une hyperplasie et une nécrose de la muqueuse. Ce processus entraîne la perte des cellules ciliées de l'appareil respiratoire (43).

Dans un second temps, contrairement au virus BRSV, le BPI3 est capable de se multiplier spécifiquement dans les macrophages pulmonaires, ce qui altère leurs fonctions. Cela se traduit par une diminution de la phagocytose des macrophages, de la cytotoxicité des cellules infectées et une sécrétion accrue de prostaglandines pro-inflammatoires (44).

Ainsi l'infection par le BPI3 entraîne, chez les bovins, de nombreuses modifications dans l'appareil respiratoire. La diminution de la ciliature des cellules ciliées dans la trachée, la présence d'inclusions cytoplasmiques et la desquamation, ainsi que la

destruction des cellules épithéliales respiratoires soulèvent la question du rôle du BPI3, en tant qu'agent initiateur des BPI.

Malgré ces observations, le pouvoir pathogène direct du virus n'est pas totalement établi. La plupart des infections expérimentales sont souvent subcliniques ou bénignes. Beaucoup de recherches démontrent, cependant, la prédisposition des animaux déjà contaminés avec BPI3 à être surinfectés par d'autres virus ou bactéries (44).

iii. **Mycoplasmes : *Mycoplasma bovis***

Mycoplasma bovis fait partie de la classe des Molliculites et de la famille des *Mycoplasmataceae*. Cette famille se divise en 4 genres : *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Eperythrozoon* et *Haemobartonella*. Le genre *Mycoplasma* comporte environ 100 espèces dont 40 isolées chez les ruminants dont *Mycoplasma bovis*. Cette bactérie est considérée comme la plus pathogène des mycoplasmes en Europe et en Amérique du Nord, là où la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) à *Mycoplasma mycoides* est absente.

Les BPI à *M. bovis* se rencontrent majoritairement suite à l'allotement de jeunes bovins (sevrés ou non) dans un nouvel élevage. La contamination se fait très généralement par l'introduction de malades et parfois de porteurs sains. Une transmission horizontale par contact direct entre les animaux et les aérosols, par l'alimentation ou par l'eau de boisson est aussi possible. En effet, il a été démontré lors d'une étude expérimentale, que cette bactérie peut persister plusieurs semaines dans de l'eau ou sur du matériel humide, et jusqu'à 230 jours dans le fumier (45).

De nombreuses études montrent l'importante prévalence de cet agent pathogène avec plus de 70% sur des échantillons positifs (46). D'autre part, sa présence semble être corrélée par l'apparition de signes cliniques respiratoires chroniques ou aigus : le pourcentage d'échantillons positifs varie en fonction des signes cliniques : 0% chez des animaux sains, 35,5% chez des animaux à pneumonie chronique et 50% chez des animaux à pneumonie aiguë (45)

L'infection par *M. bovis* entraîne diverses lésions pulmonaires des bronches et des bronchioles. Il existe une persistance de la bactérie sur du long terme grâce à sa capacité d'échapper à la réponse immunitaire. En effet, *M. bovis* possède 13 gènes codant pour des protéines de surface impliquées dans la variabilité antigénique (47).

En plus des lésions pulmonaires, *M. bovis* peut être responsable de polyarthrites chez les veaux, d'infections génitales, de mammites et d'avortements chez les adultes (45).

iv. Pasteurelle : *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica est la pasteurelle réputée la plus pathogène chez les bovins notamment à l'engraissement. En effet, elle peut agir en tant qu'agent pathogène unique, lors d'une diminution des défenses de l'hôte, ou secondairement à une infection virale ou mycoplasmique (38).

Dans un premier temps, la multiplication de la bactérie se fait dans le nasopharynx ; puis dans un second temps, il y a un processus d'altération des mécanismes de défense de l'appareil respiratoire. Ainsi, *M. haemolytica* s'attache à l'épithélium, via des facteurs de virulence pour léser les voies respiratoires de l'hôte (cela peut être facilité lorsque la muqueuse a été préalablement lésée par un agent pathogène).

Concernant la contamination des voies respiratoires profondes, celle-ci se produit par l'inhalation de bactéries qui stagnent dans les régions postérieures des cavités nasales, où leur concentration est très élevée, surtout en début de maladie (38).

L'expression de son pouvoir pathogène dépend ainsi des nombreux facteurs de virulence de la bactérie. En effet, certains facteurs assurent l'adhésion à la cellule cible et la colonisation cellulaire, d'autres participent au dysfonctionnement de l'appareil muco-ciliaire et au clivage des anticorps IgG1 bovins produits lors de la réponse humorale. Pour finir, certains possèdent une action pro-coagulante et pro-inflammatoire, entraînant un afflux de cellules inflammatoires ainsi que des lésions vasculaires (38).

Le facteur de virulence majeur de la bactérie est la Leucotoxine LKT. Sa libération entraîne l'apoptose des neutrophiles, ce qui conduit à la libération de facteurs pro-inflammatoires et toxiques. Ces facteurs jouent un rôle dans la formation des lésions caractéristiques de la bronchopneumonie alvéolaire (48).

M. haemolytica est également une bactérie commensale du nasopharynx. Ainsi, lors d'une baisse du système immunitaire d'un veau, un stress ou une infection de l'appareil respiratoire primaire, la réponse immunitaire innée ne parviendra pas à freiner la colonisation de *M. haemolytica* et celle-ci provoquera très fréquemment des BPI.

b. Agents ayant un pouvoir pathogène modéré

i. Virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR ou BoHV-1)

La rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) est la forme respiratoire de l'infection par l'herpès virus bovin de type 1 (BoHV-1). Ce virus fait partie de la famille des *Herpesviridae*, et de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. C'est un assez gros virus, ADN double brin. L'IBR est une maladie réglementée et très surveillée en France depuis quelques années. Elle est responsable d'affection des voies respiratoires supérieures dans la majorité des cas ; mais elle est aussi impliquée dans des avortements, des métrites, des conjonctivites et des encéphalites chez le veau.

Comme tous les herpès, la particularité de cette famille est l'alternance entre des périodes de latence virale et des périodes de réactivation, et réexcrétions. Malgré la grande variation du pouvoir pathogène en fonction des différentes souches, ce virus a pour affinité, spécifiquement les cellules épithéliales, les cellules mononucléées sanguines et les neurones (49). La contamination se fait, en général, essentiellement de proche en proche par voie respiratoire. Une phase clinique ou subclinique apparaît mais est souvent neutralisée par le système immunitaire. Le virus, alors, rentre en phase de latence, et les animaux infectés deviennent ainsi porteurs asymptomatiques. Ces animaux asymptomatiques sont capables de réactiver, puis réexcréter le virus dès lors d'un changement dans leur environnement, d'un stress ou d'un traitement médical. Dans sa forme respiratoire le BoHV-1 n'est pas directement responsable de BPI. Sa localisation se limite au rhinopharynx et à la trachée. Toutefois, son rôle en tant

qu'agent initiateur des BPI a été très étudié. En effet, il semblerait que le BoHV-1 favoriserait l'apparition de BPI via 3 actions : une cytolysse directe des cellules épithéliales respiratoires, la production de cytokines pro-inflammatoires et un effet supprimeur sur la réponse immunitaire cellulaire (49).

ii. **Coronavirus bovin (BCoV)**

Le BCoV appartient à la famille des *Coronaviridae* et fait partie du genre *Betacoronavirus*. D'autres virus respiratoires appartiennent à ce même genre tels que le virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère apparu en Asie en 2003 (SARS-CoV), le coronavirus du syndrome respiratoire au Moyen-Orient (MERS-CoV), le coronavirus respiratoire humain (HCoV OC43) ou bien le SARS-CoV-2 responsable de l'épidémie mondiale apparue en 2019 (plus connu sous le nom de COVID-19).

Comme tous les virus appartenant à cette famille, BCoV est un virus sphérique enveloppé avec un ARN simple brin.

Le BCoV possède un tropisme à la fois respiratoire et digestif. En effet, le virus se transmet soit par les aérosols, soit par la voie fécale-orale. Il infecte ainsi les cellules épithéliales des cornets nasaux, de la trachée ou des poumons pour la voie respiratoire ; ou bien, les villosités de l'intestin grêle et les cryptes du gros intestin pour le système digestif notamment chez le veau. Sa capacité à adhérer et entrer dans les cellules hôtes sont dues à deux protéines de surface : l'hémagglutinine estérase (HE) et la protéine de la spicule (S). Ces protéines sont également très efficaces dans la protection du virus puisqu'elles produisent des anticorps neutralisants protecteurs (50).

Même si le tropisme du virus est assez bien connu, le lieu de réplication initiale fait encore débat. En effet, certaines études démontrent l'excrétion du virus via les sécrétions nasales et les fèces. D'autres, affirment que la réplication initiale du virus se fait uniquement dans les voies respiratoires. En effet, celui-ci est protégé par du mucus sécrété en grande quantité, puis, une fois dégluti, infecte le tractus digestif (51).

Une fois dans le système respiratoire, le virus provoque la nécrose de l'épithélium alvéolaire, ce qui peut entraîner une hyperplasie des pneumocytes de type II, ainsi que

l'infiltration de macrophages et de cellules lymphoïdes dans l'interstitium. Tout ce processus conduit au développement d'une pneumonie interstitielle (50). Dans les cornets nasaux et la trachée, les lésions épithéliales favorisent alors les surinfections bactériennes (51).

iii. Adénovirus bovin de type 3 (BAV-3)

Le BAV-3 appartient à la famille des *Adenoviridae*, et au genre *Mastadenovirus*. Ce virus est un petit virus à ADN très stable dans le milieu extérieur qui peut provoquer divers signes respiratoires (52). Très fréquemment, ce virus ou ses anticorps spécifiques sont isolés sur des animaux sains. En effet, une majorité des infections dues à BAV-3 est subclinique (52).

Histologiquement, les lésions observées chez les bovins infectés par le BAV-3 sont principalement retrouvées sur les poumons. Elles se caractérisent par une infiltration de cellules inflammatoires entraînant une bronchite nécrosante, une prolifération de cellules alvéolaires de type II et un épaississement de leurs parois (53).

Des études plus récentes ont montré que le gène E1A codé par l'adénovirus peut s'assembler avec des protéines de l'hôte afin d'affecter et supprimer la réponse immunitaire innée (54).

iv. Virus de la diarrhée virale bovine (BVDV)

Ce virus fait partie de la famille des *Flaviviridae*, et au genre *Pestivirus*. Le BVDV est un petit virus enveloppé avec un ARN simple brin lui conférant une grande variabilité génétique.

Le virus de la diarrhée virale bovine est considéré comme ayant un pouvoir pathogène respiratoire assez faible. En effet, lors d'études expérimentales, l'inoculation de la souche virale n'a abouti qu'à des lésions mineures dans l'élevage (55). Ainsi, le virus serait peu pathogène lorsqu'il est seul. Toutefois, d'autres recherches ont montré sa capacité de réplication dans la muqueuse respiratoire (56).

Cependant, le BVDV est responsable d'une immunosuppression directe, par destruction temporaire des lymphocytes, des neutrophiles et des thrombocytes

entraînant une lymphopénie, une neutropénie et une thrombocytopénie qui va persister pendant 5 à 15 jours après l'infection. Cette immunodépression permet alors la contamination du poumon par d'autres virus ou bactéries et l'apparition très fréquente des BPI (57).

v. Pasteurelle : *Pasteurella multocida*

Comme *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* est une Pasteurelle faisant partie de la flore commensale des muqueuses des vertébrés. Chez les bovins, ces bactéries sont présentes dans le nasopharynx, et le portage asymptomatique concernant plus de 30% des adultes (58).

Toutefois, contrairement aux autres espèces de ce groupe, le pouvoir pathogène de *P. multocida* semble être limité (59). Son caractère opportuniste permet de profiter d'une dépression du système immunitaire de l'hôte afin de proliférer et coloniser les poumons.

Les signes cliniques observés lors d'une BPI ne sont présents que s'il y a une association avec d'autres bactéries ou des virus.

Les mécanismes de contamination du tractus respiratoire sont encore, aujourd'hui, peu documentés. Les principaux facteurs de virulence identifiés sont la capsule, permettant de résister dans l'organisme et d'éviter la phagocytose ; et le lipopolysaccharide essentiel pour la survie de la bactérie dans l'hôte. Globalement, elle semble posséder les mêmes facteurs de virulence que *M. haemolytica*, sauf la leucotoxine (60).

vi. Pasteurelle : *Histophilus somni*

Pour finir, *Histophilus somni* est également une Pasteurelle souvent isolée dans les prélèvements respiratoires des bovins présentant des signes de BPI.

Cette bactérie a été identifiée pour la première fois en 1956 sur un bovin présentant une méningo-encéphalite thromboembolique. Pendant longtemps, la seule manifestation clinique semblait être celle-ci. Cependant *H. somni* est responsable d'autres affections, en particulier des affections respiratoires (61).

En effet, comme *P. multocida*, *H. somni* est une bactérie commensale présente dans le nasopharynx du bovin. Une trop forte présence de cette bactérie entraîne une modification et une perturbation de la flore. Lorsqu'elle est présente en excès, *H. somni* augmente l'activité du facteur tissulaire des cellules endothéliales, et perturbe les jonctions intercellulaires. Cette action a pour effet de renforcer l'activité pro-coagulante de l'endothélium et de rendre sa monocouche plus perméable. Ainsi, *H. somni* peut se disséminer dans la circulation sanguine et entraîner des thrombus tout en fragilisant le tractus respiratoire.

Toutefois, *H. somni* possède un faible pouvoir pathogène et se développe généralement en co-infection avec des virus ou des bactéries lors de surinfections qui provoquent les BPI (61).

En plus des affections respiratoires, *H. somni* peut être responsable d'infertilité, d'avortement, de septicémie, de myocardite, d'arthrite ou de méningoencéphalite (62).

4. Les interactions entre agents pathogènes

La BPI est, aujourd'hui, une maladie reconnue comme polyfactorielle et le plus souvent polymicrobienne. De nombreuses recherches sur la prévalence des agents pathogènes suggèrent une association très fréquente entre agents pathogènes lors d'une infection. Par exemple, lors d'une épidémie respiratoire au Brésil en 2018, sur 23 bovins, 41% présentaient un résultat positif pour au moins deux agents pathogènes (63). De même au Canada, lors d'une étude de quatre ans, sur un total de 883 bovins, 50,73% des écouvillons nasaux prélevés étaient positifs pour au moins deux agents pathogènes (64).

D'après plusieurs recherches, les associations entre agents pathogènes provoquant des BPI sont souvent les mêmes. Les plus fréquentes sont BRSV/BCoV (9), *P. multocida*/*H. somni*, *P. multocida*/BRSV, *P. multocida*/*M. haemolytica*, *H. somni*/BRSV, et BRSV/BPI3 (65). Toutefois, il est difficile d'affirmer avec certitude qu'il existe des associations préférentielles entre agents pathogènes. En effet, ces associations

dépendent des pays, des systèmes d'élevage étudiés et de la méthodologie utilisée pour détecter leur présence.

De plus, comme pour tous les mammifères, il existe une flore bactérienne commensale chez les bovins qui peut soit interférer avec la détection d'agents infectieux lors de prélèvement ; soit interagir avec les agents pathogènes lors des BPI.

En effet, le microbiote respiratoire se développe dès les premiers mois de vie du veau et est propre à chaque individu, en fonction de son lieu et sa qualité de vie. Cette flore est viable grâce à un équilibre formé entre les bactéries, et permet de se défendre face à une infection (66).

Au cours du temps, le microbiote évolue grâce à différents facteurs tels que l'environnement, le régime alimentaire, les antimicrobiens parentéraux, et les événements dans les élevages (les maladies, les événements stressants, l'introduction de nouveaux animaux). Le microbiote respiratoire qui en résulte va donc se diversifier et s'enrichir afin de créer une meilleure défense et résistance pour l'organisme.

Un déséquilibre ou une atteinte de cette flore par des processus inflammatoires, une baisse d'immunité ou une colonisation des voies respiratoires par un agent pathogène primaire peut dérégler la flore et créer une prolifération excessive opportuniste d'une bactérie naturellement présente dans le tractus respiratoire (67).

Le microbiote est donc à la fois une protection naturelle pour son hôte, mais aussi une source de contamination.

a. Interactions entre virus et bactéries

L'apparition d'une infection virale primaire suivie d'une surinfection bactérienne est le modèle de co-infection le plus courant et le mieux documenté pour les bovins, les porcs mais aussi les humains (68).

La synergie d'infection se traduit par plusieurs mécanismes spécifiques et non spécifiques.

Parmi les mécanismes non spécifiques, l'infection par des virus peut entraîner une lyse généralisée, de l'épithélium cilié dans la trachée ou des voies aériennes profondes. Ce processus entraîne une perturbation de la fonction de l'escalator mucociliaire. Cette

fonction permet l'élimination naturelle des bactéries dans le tractus respiratoire. Lors d'une dégradation, les bactéries ne sont plus expulsées et vont généralement se déposer dans les voies aériennes, notamment dans les alvéoles, provoquant une contamination.

D'autres virus, tel que le BoHV-1, provoquent une immunosuppression chez un individu infecté. Cette immunosuppression peut être traduite par une régulation négative de l'interféron, l'apoptose des leucocytes, la réduction de l'expression des molécules CMH et entraîne une diminution de l'élimination des cellules infectées par des virus (16). Le BVDV ou le BRSV va simplement induire une baisse de l'immunocompétence et permettre la prolifération bactérienne des voies respiratoires (69,70).

Concernant les mécanismes plus spécifiques, il existe des effets synergiques entre couples bactéries et virus tels que BRSV/*P. multocida* (71).

En effet, une étude sur la co-infection entre ce couple a mis en évidence une augmentation accrue d'adhérence de *P. multocida* sur des cellules déjà exposées au BRSV par rapport à des cellules non exposées. Ils ont également remarqué, lors de co-infection, une augmentation de l'expression de l'ARNm IL-6 par l'hôte et une accumulation accrue du récepteur du facteur d'activation des plaquettes (71). In vitro, il a été démontré que l'adhérence de *P. multocida* dépendait de l'expression de ce facteur d'activation des plaquettes (70). Ces travaux mettent en relation un mécanisme spécifique de surinfection bactérienne grâce à l'infection de BRSV. Cette synergie a également été beaucoup observée lors d'études sur le terrain (64).

Dans une étude plus récente, les mêmes auteurs ont voulu se concentrer sur la co-infection BCoV/*P. multocida*. De même, il a été observé une augmentation de l'adhérence de *P. multocida* suite à une infection par le BCoV. En plus de cette augmentation, l'expression accrue de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et du facteur d'activation des plaquettes a fait penser à un même mécanisme de synergie que pour le BRSV (72).

En 2013, Agnes *et al.* ont étudié la surinfection par *H. somni* suite à la présence de BRSV (73). Cette co-infection a entraîné une forte cytotoxicité des cellules épithéliales alvéolaires permettant le passage de *H. somni* à travers la barrière cellulaire des alvéoles. De plus, une augmentation de l'expression et de l'activité de protéases (MMP1 et MMP3) impliquées dans la dégradation protéolytique de protéines matricielles ont été remarquées. Cela peut être la raison pour laquelle la co-infection par ces agents a des conséquences plus graves sur l'appareil respiratoire (74).

Pour finir, une étude récente a montré que la co-infection entre BRSV et *M. haemolytica* exacerbait la production de l'interleukine 17 (IL-17) dans les cellules mononucléaires du sang périphérique. Cette interleukine est une cytokine jouant un rôle très important dans le recrutement des neutrophiles et dans l'inflammation. Cela peut expliquer la conséquence sévère lors d'une infection par la pasteurellose à *M. haemolytica* chez les veaux (75).

b. Interactions entre virus

Même si le modèle virus/bactérie est le plus fréquent et le mieux décrit chez les bovins, il existe quelques études montrant une dynamique de co-infection virus/virus, notamment entre BVDV/BRSV, BVDV/BoHV-1 et BVDV/BCoV (76–78).

Le BVDV a été utilisé dans ces trois études comme infection virale primaire. La raison probable est que ce virus provoque une immunosuppression chez l'hôte. Une surinfection par un autre virus est ainsi plus facile à observer lorsque le système immunitaire de l'hôte est affaibli (79).

Lors d'une étude réalisée par Pollreis *et al.* (1997) sur des veaux âgés entre neuf et douze mois, l'infection simultanée de BRSV et de BVDV a abouti à des signes cliniques plus graves, avec de la fièvre, de la diarrhée et des lésions pulmonaires, en comparaison à leurs congénères mono-infectés (80).

En effet, les veaux présentant cette co-infection avaient une durée d'excrétion virale du BRSV et du BVDV plus longue dans leurs sécrétions nasales, et des niveaux infectieux plus élevés, par rapport aux bovins infectés seulement par BRSV ou par BVDV (15). In vivo, la co-infection par BRSV et BVDV montre une suppression de la

fonctionnalité des macrophages alvéolaires (81). Cela peut expliquer l'augmentation des lésions pulmonaires observées par Pollreis *et al.* (1997).

Concernant la co-infection entre BVDV et le BoHV-1, une étude réalisée en 2011 a aussi indiqué des signes cliniques sur les veaux et des lésions sur les poumons plus intenses, une augmentation de la sécrétion de TNF α et une production réduite et retardée d'IFN γ et de faibles niveaux d'IL-12 lors de co-infection (82).

Pour le BCoV, Ridpath *et al.* (2020) ont réalisé une étude *in vivo* en utilisant différentes séquences, avec différents délais de surinfection. Certains veaux ont été inoculés avec le BVDV suivi du BCoV, 3 jours et 6 jours plus tard. Les bovins présentant des signes cliniques et des lésions pulmonaires plus prononcés étaient ceux avec 6 jours de délai. Cela démontre que le moment de l'infection secondaire joue un rôle important dans la pathogénèse de la co-infection (76).

Dans la même étude, certains veaux ont été infectés par BCoV en premier, suivi du BVDV 3 jours plus tard. Les signes cliniques et les lésions pulmonaires n'étaient pas aussi prononcés que chez les animaux pré-infectés par le BVDV. Ce point suggère que l'agent pathogène initial lors d'une infection, joue un rôle essentiel dans le développement de la co-infection.

Le BRSV, connu également pour moduler les réponses immunitaires de l'hôte, pourrait jouer un rôle similaire à BVDV lors des BPI (83).

c. Interactions entre bactéries

Les interactions entre bactéries sont assez diverses. Il existe des interactions positives et des interactions négatives. Une association dite positive se fait lorsqu'une bactérie favorise la présence d'une autre bactérie. Il existe plusieurs mécanismes tels que le mutualisme, le commensalisme ou la symbiose. Une association positive est également possible lorsqu'une bactérie aide une autre à échapper au système immunitaire de l'hôte.

D'un autre côté, les associations négatives sont induites par des interactions antagonistes, ou de prédation provoquée par la compétition entre les bactéries dans

le même habitat. Le système immunitaire peut ainsi favoriser la présence d'une espèce de bactérie en dégradant une autre.

Le modèle de co-infection bactérienne dans l'appareil respiratoire bovin est très rarement étudié lors d'études sur les BPI. Même si beaucoup d'agents pathogènes respiratoires bactériens sont trouvés simultanément chez les animaux malades, les recherches sur leurs mécanismes d'interaction dans l'appareil respiratoire du bovin restent rares (64).

En effet, la reproduction des signes cliniques de la BPI dues à des bactéries, seules ou en association, est parfois très compliquée. Il existe parfois une forte variation des résultats dans la bibliographie du fait des caractéristiques intrinsèques sur les animaux utilisés (état immunitaire, âge et race) mais aussi à cause des différences souches bactériennes inoculées chez les bovins.

Afin de mieux comprendre leur synergie, Corbeil *et al.* (1985) ont cultivé ensemble différentes souches bactériennes (*P. multocida*, *M. haemolytica* et *H. somni*) avec la flore microbienne commensale afin d'examiner si elle inhibait ou renforçait leur croissance. Dans la majorité des cas, les souches microbiennes commensales favorisaient la croissance des Pasteurelles. Seul le genre *Bacillus* a démontré avoir un pouvoir inhibiteur sur la croissance des pasteurelles (84).

Une autre étude réalisée en 2012 a montré l'effet inhibiteur de *P. multocida* sur la croissance de *M. haemolytica*. Lorsque les deux souches sont cultivées individuellement, *P. multocida* et *M. haemolytica* ont montré des caractéristiques de croissance similaire. Cependant, lorsqu'on met les deux souches en commun, la charge de *M. haemolytica* était largement inférieure à *P. multocida* 24h après la mise en culture.

Lorsqu'il y a une membrane empêchant le contact direct des deux bactéries, mais que celles-ci sont dans la même culture, la croissance des deux bactéries est similaire.

Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'inhibition est possible grâce au contact des bactéries et non par des sécrétions antimicrobiennes (85).

Plus récemment, une étude a repris les résultats de Corbeil *et al.*, sur le potentiel des *Bacillus* présents dans le tractus respiratoire, à inhiber la croissance et la colonisation des pasteurelles. Dans cette étude, plusieurs souches telles que *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* ainsi que *Streptococcus thermophilus* et *Paenibacillus polymyxa* ont montré un effet inhibiteur sur *M. haemolytica*. Le mécanisme d'action serait la sécrétion de substances antimicrobiennes puisque l'effet inhibiteur existe aussi lors de l'utilisation du surnageant des cultures utilisées (86).

III. Identification de nouveaux agents pathogènes respiratoires : Cas du virus Influenza D ou IDV

1. Identification de nouveaux virus par séquençage de nouvelle génération à haut débit (NGS) des génomes viraux

Le séquençage à haut débit (NGS) et l'analyse bio-informatique sont des outils permettant de récolter un maximum de séquences génétiques et d'informations dans les prélèvements. Elles permettent ainsi d'identifier le maximum d'agents pathogènes (virus ou bactéries selon les méthodologies) y compris ceux représentés en faibles quantités, et parfois même des agents non connus en début analyse.

Initialement, le séquençage était effectué par des technologie dites de Sanger. Il était possible à chaque cycle de récupérer jusqu'à 96 séquences d'ADN avec une longueur moyenne de 650 pdb. Aujourd'hui, de nouvelles technologies ont été développées telle que le NGS. Il s'agit d'un séquençage à haut débit, commercialisé au début des années 2000. Sa particularité est de séquencer parallèlement plusieurs millions de molécules d'ADN, de différentes tailles en un temps réduit. Actuellement, les plateformes NGS de deuxième génération, les plus exploitées, sont Illumina (Miseq, Hiseq et Novaseq), et Ion Torrent de Life Technologies (PGM et Ion Proton). Ces plateformes sont très utilisées dans les projets de métagénomique et d'écologie microbienne car elles fournissent un grand nombre de données (87).

Il existe également des plateformes dites de troisième génération telles que Pacific biosciences (PacBio SMRT), ou Oxford Nanopore (MinION, GridION, PromethION, SmidgION). La caractéristique de cette génération est d'obtenir un génome complet grâce à sa capacité de lecture d'un matériel génétique de très grande taille sans nécessité de l'amplifier au préalable (87,88). Grâce à la profondeur du séquençage, cette technologie peut même détecter et identifier des génomes minoritaires dans un prélèvement (90).

Toutefois, il existe des limites à ces méthodes. Dans un premier temps, il y a la faisabilité et la difficulté technique pour la machine, à générer et interpréter les millions de séquences d'ADN ou d'ARN présents dans le prélèvement. De plus, ces processus ne répondent pas à la question de la responsabilité de l'agent identifié par rapport à la maladie ; elles identifient seulement la séquence présente sur l'échantillon. Par exemple, il existe de nombreux virus sur la planète mais seulement une infime partie est considérée comme pathogène (91). Ainsi, les prélèvements d'animaux malades peuvent présenter des agents commensaux et des agents pathogènes, mais le séquençage ne va pas différencier ces deux groupes.

Si ces méthodes révolutionnaires permettent d'identifier les génomes d'agents infectieux, les isolements sont parfois très compliqués et limitent par conséquent les études in vitro, permettant de mieux comprendre le fonctionnement du virus ou de la bactérie. Le caractère infectieux d'un agent potentiellement pathogène se fait grâce aux études terrains et expérimentales. Ces méthodes permettent d'obtenir des données épidémiologiques et expérimentales comme la séroprévalence, la prévalence de l'agent dans différentes populations, la charge de l'agent chez les malades par rapport aux individus sains, le tropisme dans l'organisme, la durée d'excrétion de l'agent pathogène, le profil de la réponse immunitaire et les facteurs de risque associés (92). Toutes ces données sont nécessaires pour bien comprendre le rôle d'un virus ou d'une bactérie.

2. Nouveau virus : Virus Influenza D

a. Historique

Le Virus Influenza D (IDV) a été isolé pour la première fois en 2011 à partir d'écouvillons nasaux chez des porcs aux Etats-Unis. Ces porcs présentaient des symptômes grippaux (93).

Au début, les échantillons ont été testés contre le virus de la grippe A, mais ils se sont avérés négatifs. Ne sachant pas quel était le virus responsable de la maladie de ces porcs, d'autres observations ont été réalisées, rapportant des effets cytopathiques similaires à ceux induits par les virus grippaux en général. En microscopie électronique, le virus semblait fortement ressembler morphologiquement à un virus de la famille des *Orthomyxoviridae* (famille qui rassemble les quatre types de virus de la grippe). Les tests enzymatiques, eux, ont montré une faible activité neuraminidase mais une activité O-acétylestérase détectable, suggérant une appartenance probable au genre Influenza C, mais cela a été infirmé par RT-qPCR (93).

Ainsi, afin de connaître quel était ce virus, le génome a été entièrement séquencé à l'aide de la technologie Ion Torrent. Ce séquençage a permis d'identifier le Virus Influenza C Humain (ICV) comme virus existant actuellement, le plus similaire à celui retrouvé dans les prélèvements. Comme pour ICV, ce nouveau virus contenait sept segments d'ARN génomique, contrairement à IAV et IBV qui en ont huit. Toutefois, le segment PB1 du nouveau virus, qui est considéré comme le plus conservé parmi tous les virus de la grippe, ne présentait que 69 à 72 % de similarité avec la protéine PB1 du virus de la grippe C ; et seulement 39 à 41 % de similarité avec les virus de la grippe A et B (94). Cela suggérait la présence d'un nouveau virus isolé appartenant probablement à un nouveau genre de grippe.

La découverte de ce nouveau virus a conduit à une appellation provisoire : C/swine/Oklahoma/1334/2011 (C/OK) (95). Par la suite, l'IDV a essentiellement été détecté chez les bovins, notamment lors de BPI. C'est pourquoi, la majorité des données scientifiques actuelles de ce virus sont dans l'espèce bovine.

Au cours du temps, d'autres études sur C/OK ont été réalisées telles que l'analyse de son ARN, des immunodiffusions sur gel d'agar afin d'évaluer la réaction croisée entre

le virus et les antisérums IAV, IBV et ICV, ou bien des cultures cellulaires mettant en évidence un tropisme de C/OK plus large par rapport à l'ICV humain, et une température de répllication pouvant aller jusqu'à 37°C pour C/OK alors que ICV ne se réplique qu'à 33°C (93).

Lors d'une recherche expérimentale, des porcs et des furets ont été infectés par voie intranasale avec C/OK afin d'étudier son pouvoir pathogène. Chez les deux espèces, le C/OK a réussi à se répliquer dans les voies respiratoires supérieures et la transmission par contact direct sur les animaux naïfs était possible. Même si tous les animaux infectés ont présenté une séroconversion dans les trois semaines post infection C/OK, aucun signe clinique ni de lésions histopathologiques typique de la grippe n'ont été observés (93).

Ainsi, suite à de nombreuses recherches sur C/OK et ses différences avérées avec les autres virus grippaux déjà connus, il a été proposé en 2014, la création d'un nouveau genre dans la famille des *Orthomyxoviridae*. Ce nouveau genre est, aujourd'hui, connu sous le nom de *Deltainfluenzavirus* ou Virus Influenza D, étendant ainsi les *Orthomyxoviridae* à neuf genres (94).

Par la suite, les analyses sur les prélèvements présentant des signes respiratoires ont inclus la recherche de l'IDV comme agent pathogène. Deux grands clades ont alors été découvert à l'heure actuelle. Il y a les clades D/OK et D/660, décrits en Amérique du Nord, en Europe et en Chine. De multiples évènements de réassortiment entre ces groupes ont été publiés. Par exemple, en Europe, un clade génétiquement divergent a été analysé en 2012 en France, et en 2014 en Irlande, représenté par les souches D/bovine/France/2986/2012 et D/bovine/Irlande/007780/2014.

De même dans d'autres pays, comme au Japon, des études récentes sur des EN de bovin, suggèrent la présence d'un troisième clade D/Japan distinct des deux autres mais avec 95 et 97,3% d'identité génétique observé (83,96) (Figure 1).

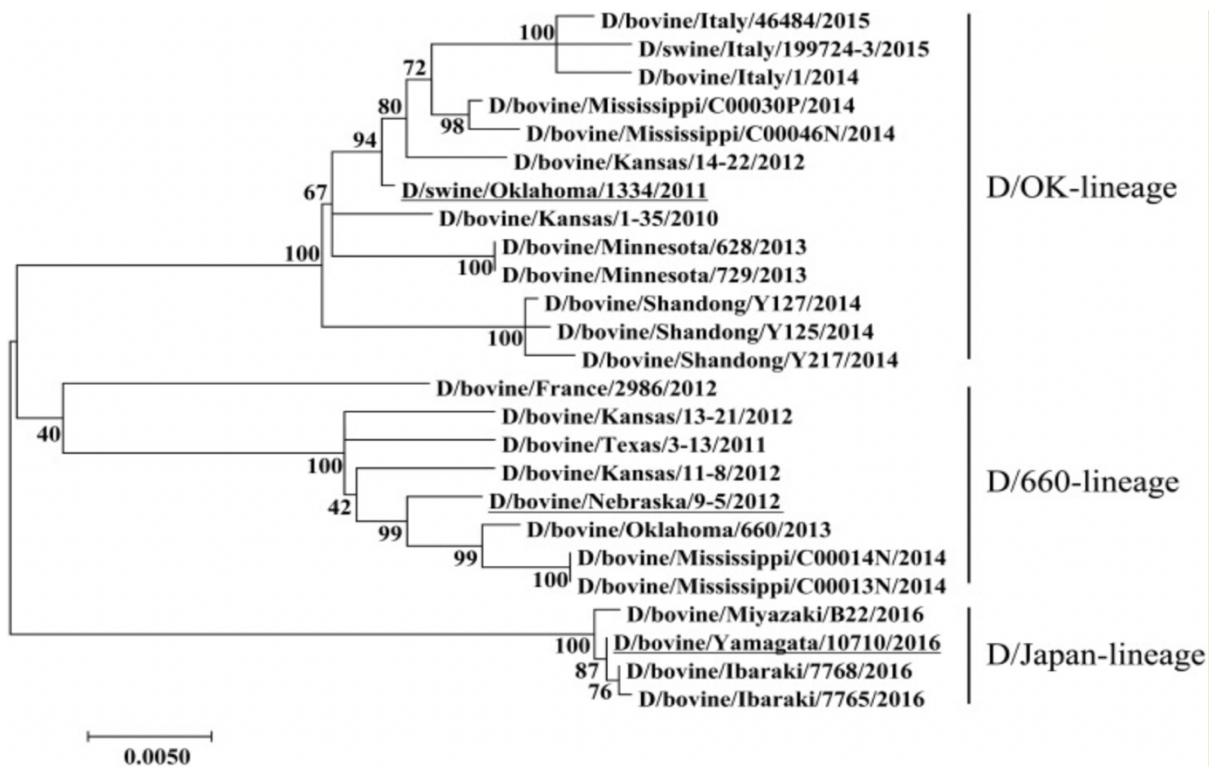


Figure 1 : Arbre phylogénétique représentant les trois clades d'IDV (Odagiri et al. 2018)

b. Répartition géographique et origine du virus

D'après les études épidémiologiques réalisées à ce jour, le virus IDV a été détecté dans plusieurs pays sur quasiment tous les continents (figure 2).

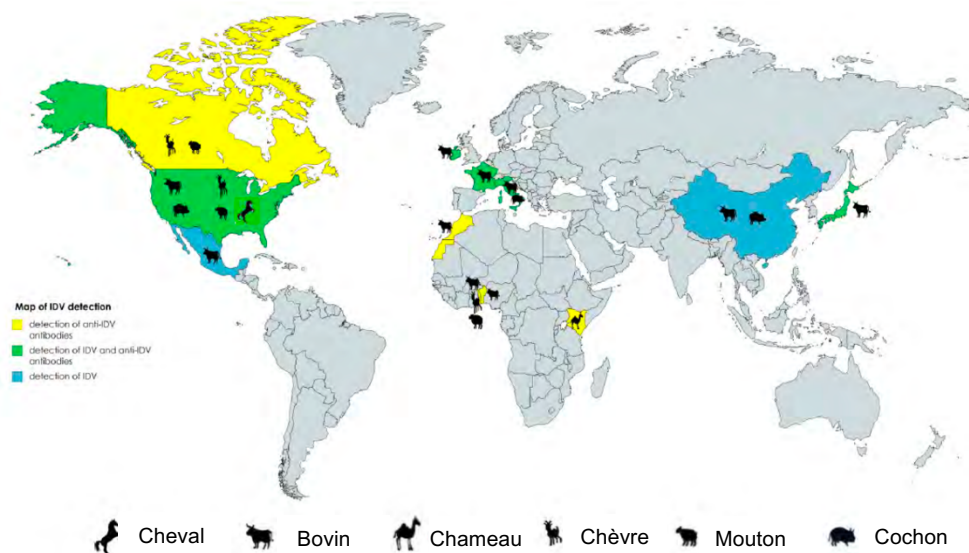


Figure 2 : Carte de la circulation mondiale de l'IDV (Olivia 2020)

En bleu : détection du virus par PCR ; En jaune : détection des anticorps anti-IDV ; En vert : détection du virus et des anticorps. Chaque pictogramme représente l'espèce chez laquelle IDV a été détecté.

Depuis sa découverte aux Etats-Unis en 2011, les questions sur l'origine de l'IDV restent floues. En effet, plusieurs scénarios sur l'apparition de ce virus ont été formulés tels que la mutation de l'IDC humain vers un nouveau virus IDV, ou l'hypothèse que l'IDV a pu circuler silencieusement chez différents hôtes jusqu'à sa propagation récente aux animaux domestiques (les bovins, les porcs...) (97).

Toutefois, les données moléculaires et sérologiques actuelles suggèrent que l'IDV a atteint, dans un premier temps, la population bovine, au moins à partir de 2003 selon les données disponibles.

Une première hypothèse amène à penser que l'IDV a été transmis par un hôte inconnu à la population bovine. Les bovins, étant très réceptifs au virus, ont favorisé le maintien dans l'environnement. La seconde hypothèse s'attarde sur un réservoir naturel inconnu, qui est encore responsable de son maintien et de la dissémination du virus dans l'environnement.

D'après les données épidémiologiques, la première hypothèse semble la plus probable. Cependant, il est difficile de croire que seuls les bovins ont contribué à la propagation mondiale de l'IDV en un temps relativement court.

Des nouvelles hypothèses sur un deuxième hôte accidentel, permettant la propagation du virus, comme les hommes ou les oiseaux migrateurs ne sont donc pas à négliger (15).

D'autres études sérologiques et moléculaires, sur des échantillons grippaux (potentiellement IDV), collectés antérieurement à la découverte du virus, pourraient être très utiles pour comprendre la dynamique et la propagation de ce virus à travers les espèces. Cependant il a été mis en évidence chez l'homme des réactions croisées entre IDV et ICV et d'autres espèces, limitant la certitude de la spécificité des anticorps testés (98).

c. Le spectre d'hôte

De multiples hôtes tels que les bovins, les porcs, les petits ruminants, les chevaux et même les camélidés présentent des anticorps anti-IDV.

Toutefois, les données épidémiologiques ont révélé une prévalence du virus, plus élevée chez les bovins par rapport aux autres espèces. Cela laisse supposer que les bovins seraient les hôtes principaux pour l'IDV.

i. Les bovins

Aujourd'hui, l'hôte primaire de l'IDV semble être le bovin en raison de sa forte prévalence dans cette espèce et des données obtenues sur la physiopathologie de l'infection chez les bovins.

En effet, après la découverte de ce nouveau virus en 2011, des échantillons d'archives datant de 1977 à 2003 ont été testés afin de détecter la présence d'anticorps anti-IDV. Les résultats ont été positifs à partir de 2003 (98). Deux autres études similaires aux Etats-Unis ont mis en évidence la forte séroprévalence chez des bovins prélevés aussi en 2003 (99,100).

Une autre expérience réalisée en 2014 dans le Nebraska, a utilisé des échantillons prélevés en 2004 et a montré que sur les 40 fermes sélectionnées au hasard, les bovins adultes étaient fortement séropositifs, et environ 98 % des veaux nouveau-nés de ces fermes présentaient un taux d'anticorps maternels élevé contre le IDV. Cette analyse suggère que des expositions à ce virus étaient présentes chez les bovins du Nebraska depuis au moins 2003 (99).

Au cours du temps, de nombreuses recherches à travers le monde ont été réalisées dans les exploitations bovines, en Afrique, en Europe ou en Asie (15). La prévalence sérologique de cette espèce est généralement élevée et varie entre 48% et 96% (101).

Grâce à de nombreuses expérimentations, notamment in vivo, la pathogénie du virus est aussi mieux connue. Il a été démontré que sa réplication était possible dans les voies respiratoires supérieures et profondes du bovin et que l'infection pouvait provoquer des signes respiratoires légers à modérés. Des lésions microscopiques ont aussi pu être mises en évidence dans les tissus pulmonaires des bovins lors d'infections expérimentales (102–104).

Pour finir, la transmission par aérosol dans les stabulations permettant la contamination aéroportée des animaux a été démontrée, pour de courtes distances (105).

L'ensemble de ces observations laisse à penser que le bovin est l'hôte principal du virus IDV.

ii. Les porcs

A contrario, la population porcine semble limiter la diffusion de l'IDV. En effet, quelques écouillons nasaux et des sérums de porcs, aux Etats-Unis, en France, en Chine, en Italie, en Irlande et au Luxembourg, ont été testés positifs contre le virus. La prévalence globale est évaluée aujourd'hui entre 0,6% et 11,7%, plus faible que chez le bovin (15).

Lors d'infection expérimentale, aucun signe clinique n'a été observé sur les animaux infectés. Toutefois, le virus peut effectivement se répliquer dans les voies respiratoires supérieures et être transmis par contact direct entre les animaux (106,107).

iii. Les petits ruminants

L'infection par IDV a été décrite chez les petits ruminants grâce à des tests sérologiques. Aux Etats-Unis, des prélèvements sur des moutons (n=85) et des chèvres (n=64), entre 2001 et 2007, ont été analysés contre IDV mais tous se sont révélés négatifs. Quelques années plus tard, en 2014, de nouveaux prélèvements et analyses ont été faits, montrant une prévalence de 15,3 % (17/111) pour les ovins et de 25,9 % de positif (7/27) pour les caprins (108).

En France, comme aux Etats-Unis, les enquêtes sérologiques montrent une circulation très limitée du virus dans ces espèces. En effet, sur une étude française de 181 sérums d'ovins dans 45 élevages, et 430 sérums caprins dans 13 élevages, la séroprévalence de l'IDV variait entre 0 et 5,5% pour les ovins et 1,3 à 5,8% pour les caprins (109).

Lors d'études expérimentales chez les agneaux, les animaux infectés par IDV ne présentaient aucun signe respiratoire, et l'évaluation histologique des poumons n'a

révélé aucune lésion microscopique. Toutefois, il a été prouvé que le virus s'est bien répliqué, d'après l'analyse des excréctions virales dans les écouillons nasaux. Enfin, il n'a pas pu être mis en évidence de réaction inflammatoire cellulaire chez les agneaux (110).

iv. Les chevaux

Il y a très peu de données sur l'observation de l'IDV chez les équidés. Toutefois, des études sérologiques ont suggéré la circulation du virus dans 141 fermes aux Etats-Unis. Cependant, une réaction croisée entre IDV et ICV a également été mise en évidence (111).

Lors d'une infection expérimentale, les chevaux n'ont pas développé de signe clinique. Ils ont par contre, présenté une séroconversion 13 jours après l'infection. Ainsi, il est possible que le virus puisse se répliquer dans les voies respiratoires des chevaux, et donc une transmission est également possible, mais le nombre d'analyses est encore trop faible pour comprendre la pathogénicité dans cette espèce (112).

v. Les camélidés

Là aussi, il n'existe que peu de recherches sur la grippe dans cette espèce. Toutefois, une étude en 2015 a montré que sur 293 sérums de chameaux au Kenya, 99% ont été testés positifs à l'IDV. Cependant, la présence d'une réaction croisée entre les anticorps anti-IDV et anti-ICV a été prouvée (comme pour les équidés) et limite donc l'interprétation de ces résultats (113).

Plus tard, une expérimentation en 2019 a retesté la prévalence sérologique d'IDV chez des chameaux en Éthiopie en supprimant l'effet réaction croisée avec ICV. Ainsi, en utilisant plusieurs antigènes différents spécifiques à l'IDV, la population de chameaux s'est révélée positive pour l'IDV et négative pour l'ICV (114).

Ces deux observations mettent donc en évidence une réaction croisée possible entre IDV et ICV et la sensibilité des camélidés à l'infection de l'IDV. Toutefois, d'autres

études doivent être réalisées afin de mieux appréhender la pathogénicité de ce virus dans cette espèce.

vi. La faune sauvage

La majorité des études a été faite sur des animaux domestiques et non sur la faune sauvage. Ainsi, la circulation dans cette population reste encore inconnue. Toutefois, quelques recherches ont mis en évidence la présence de l'IDV chez les porcs sauvages. En effet, aux Etats-Unis, les porcs sauvages ont une séroprévalence plus élevée que les porcs domestiques. Une étude sur 96 porcs sauvages testés entre 2010 et 2013 a établi une séroprévalence globale de 42,7%, ce qui indique que le virus peut circuler activement dans cette population (115). Une infection expérimentale a prouvé que le virus IDV peut se répliquer, être excrété et être transmis de porcs malades à des porcs sains. La séroconversion est de 21 jours après l'infection.

Une étude plus récente s'est focalisée sur le cerf de Virginie en Amérique du Nord. Sur 264 sérums collectés entre 2011 et 2017, 13 échantillons sont revenus positifs pour l'IDV, soit 4,9%. Cette donnée montre une présence limitée dans cette population (116).

Des recherches en Europe, comme en Belgique et en Allemagne, ont mis en évidence une propagation limitée de l'IDV sur les chevreuils. D'autres études s'attardent sur une analyse de la séroprévalence sur les hérissons, les lamas, gnou noir ou des girafes en Namibie, mais la faible quantité de matériel génétique et le nombre limité de prélèvements rendent difficile la confirmation ou non de la présence du virus grippal (101).

vii. L'humain

L'infection par IDV chez l'homme a été suggérée via des études sérologiques et de détections moléculaires.

Aux Etats-Unis, en Floride, une étude a été réalisée sur la prévalence de l'infection par IDV chez des humains exposés à du bétail infecté par le virus ou non. Sur 46 sérums

collectés entre 2011 et 2012, 35 échantillons de sérum provenaient de personnes exposées professionnellement au bétail et 11 d'adultes non exposés. La séroprévalence d'infection à l'IDV a été calculée à 97% chez les personnes travaillant avec des bovins, et seulement 18% chez les personnes non exposées au bétail (117).

Une observation italienne effectuée entre 2005 et 2017, sur 1281 échantillons de la population humaine pris au hasard, indique la présence d'anticorps anti-IDV. Chaque année de 2005 à 2010, le nombre d'échantillons positifs aux anticorps a augmenté passant de 5,1% en 2005 à 43,4% en 2010. Il y a eu une forte diminution d'échantillons positifs, avec un pourcentage de 17,8% en 2011 ; puis une augmentation jusqu'en 2014 avec 46% d'échantillons présentant des anticorps. En 2015, seulement 25,7% étaient positifs puis 33,9% en 2016 et pour finir à 11,9% en 2017 (118).

Ces données montrent clairement que la séroprévalence de l'IDV a augmenté entre 2005 et 2017. Toutefois, cette augmentation n'a pas été constante au cours des années. Elle montre de fortes hausses suivies de chutes les années suivantes. Les pics de séroprévalence détectés chez l'homme sembleraient suivre les épidémies d'IDV chez les animaux notamment en France chez les bovins en 2011 (119) et chez les porcs en 2015, en Italie (120).

Concernant les vétérinaires, notamment les vétérinaires ruraux, facilement exposés aux virus grippaux des bovins, une étude en Italie a montré en 2004 que 4,9% des échantillons sanguins (n=82), étaient positifs aux anticorps anti-IDV (121).

De plus, récemment, l'IDV a été détecté dans plusieurs environnements urbains comme les bioaérosol des salles d'urgence à l'hôpital ou à l'aéroport (15). Ce qui prouve que ce virus est relativement présent dans notre quotidien, même si sa découverte reste assez récente.

Ainsi, en conclusion, la capacité de l'IDV à infecter l'être humain est avérée. Toutefois, l'importance de ces infections et leurs conséquences restent encore inconnues et nécessitent des études supplémentaires pour mieux caractériser le rôle zoonotique de ce virus.

d. Les propriétés générales du Virus Influenza D

i. Propriétés structurales

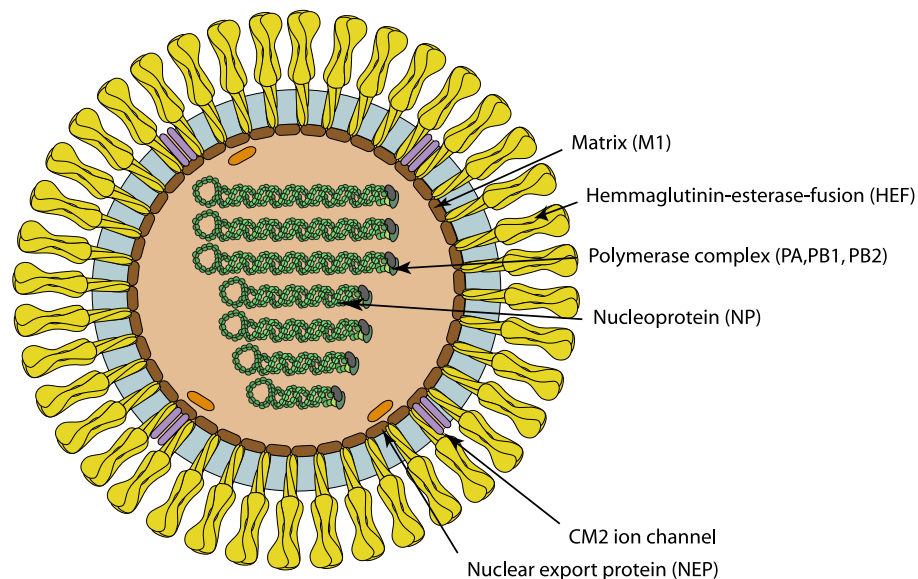


Figure 3 : Représentation schématique d'un virus de type influenza D (<https://viralzone.expasy.org/>)

L'IDV appartient à la famille des *Orthomyxoviridae*. Il s'agit d'un virus enveloppé avec un génome constitué d'ARN simple brin segmenté.

Les virions ont une forme sphérique et mesurent entre 80 et 120 nm de diamètre. En microscopie électronique, ils présentent une surface couverte de spicules qui correspondent aux glycoprotéines de surface, notamment l'hémagglutinine estérase fusion (HEF).

Sous l'enveloppe lipidique, formant la membrane plasmique, se trouvent des protéines matricielles. Au centre du virus, il y a la présence d'une structure moléculaire hélicoïdale, associant l'ARN à des complexes de nucléoprotéines et à des polymérase (103). (Figure 2)

ii. Génome viral

Le génome viral de l'IDV est constitué de sept segments d'ARN simple brin de polarité négative. (Figure 3)

Chaque segment d'ARN permet de coder une ou plusieurs protéines virales (106). Ces segments sont enveloppés par la nucléoprotéine (NP), formant alors des nucléocapsides de symétrie hélicoïdale.

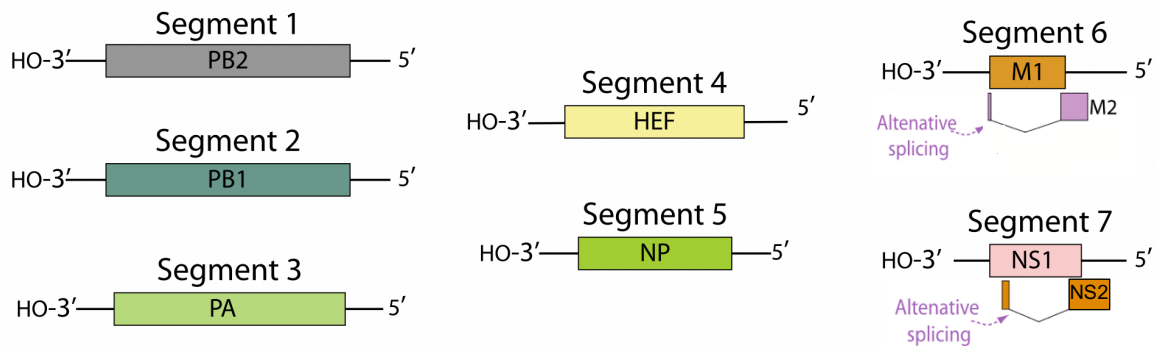


Figure 4 : Génome du virus influenza D (<https://viralzone.expasy.org/>)

À ce jour, les recherches permettant de comprendre les fonctions de chaque protéine virale sont encore en cours. Cependant, de nombreux travaux ont déjà été réalisés sur les autres virus influenza. Ainsi, par extrapolation, il est possible d'en déduire le rôle de ces protéines.

Les trois plus grands segments du génome de l'IDV codent pour la polymérase basique 1 (PB1), la polymérase basique 2 (PB2) et la polymérase A (PA). Une fois assemblées, ces trois protéines forment l'ARN-polymérase-ARN-dépendante d'IDV (101). Plus précisément, la protéine PB1 possède l'activité polymérase, qui permet la réplication du génome viral ; la protéine PB2 permet l'initiation de la transcription des ARNm cellulaires ; et la protéine PA permet le clivage de la coiffe des ARNm cellulaires.

Il a été démontré que le gène de la protéine PB1 est le mieux conservé chez tous les virus influenza. Sa séquence nucléotidique est souvent utilisée pour évaluer les relations phylogénétiques entre les différents virus de cette famille (103).

Le segment 4 code pour l'Hémagglutinine Estérase-Fusion (HEF). Cette glycoprotéine de surface va reconnaître le récepteur cellulaire de la cellule hôte afin de permettre à l'enveloppe virale de fusionner avec l'endosome en début de cycle, ou d'expulser le virus en fin de cycle.

Il a été montré que ce segment est le plus variable, à la fois entre les quatre virus de la grippe mais aussi au sein de la famille des IDV (101).

Le segment 5 code pour la protéine virale NP qui semble être associée à la fois au génome viral et aux polymérases. En effet, elle formerait des complexes de ribonucléoprotéines (RNP) permettant d'assurer la réplication et la transcription du virus dans la cellule hôte. D'après des études réalisées à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, cette protéine semble posséder des fonctions similaires à celles des NP des autres virus influenza (122).

Les deux derniers segments, le segment 6 et le 7, peuvent générer plusieurs protéines par épissage alternatif. En effet, Hause *et al.* (2014) ont montré que le segment 6 peut coder soit la protéine de matrice M1, qui joue un rôle dans la structure du virus ; soit la protéine matrice M2, qui représente un canal à proton transmembranaire.

Le segment 7 code pour des protéines non structurales NS1 et NS2. La protéine NS1 permet la réplication virale et la protéine NS2 joue un rôle dans le transport des RNP (123).

Afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte, les virus influenza présentent de forte capacité d'évolution génétique et antigénique. Plusieurs mécanismes sont utilisés comme la dérive génétique et le réassortiment génétique.

La dérive génétique permet de créer des mutations ponctuelles. En effet, elles sont dues au faible taux de fidélité de l'ARN polymérase virale. Généralement son taux d'erreur est de 10^{-4} substitutions/nucléotide/cycle. Ces erreurs modifient les séquences de nucléotides des gènes viraux et modifient ainsi le codage des protéines. La conséquence de ces mutations peut être à la fois une perte de fonction ou bien, un avantage sélectif de la protéine (124).

Le réassortiment génétique permet de passer la barrière d'espèce grâce à des échanges de segments viraux. Ce phénomène est dû à la segmentation du génome des virus influenza. Par exemple, lorsqu'une cellule hôte est infectée par deux virus

de sous-types différents, leurs segments peuvent se mélanger et ainsi créer un nouvel assemblage (et donc un nouveau virion dit « réassortant ») (124).

Concernant l'IDV, le segment le plus touché par ces mécanismes est le segment 4, qui code la protéine HEF.

iii. Le cycle de réplication

Le cycle viral de l'IDV comprend plusieurs étapes cruciales, permettant sa réplication et sa propagation dans un organisme.

Les différentes étapes du cycle sont résumées dans les paragraphes suivants et présentées grâce à la figure 4.

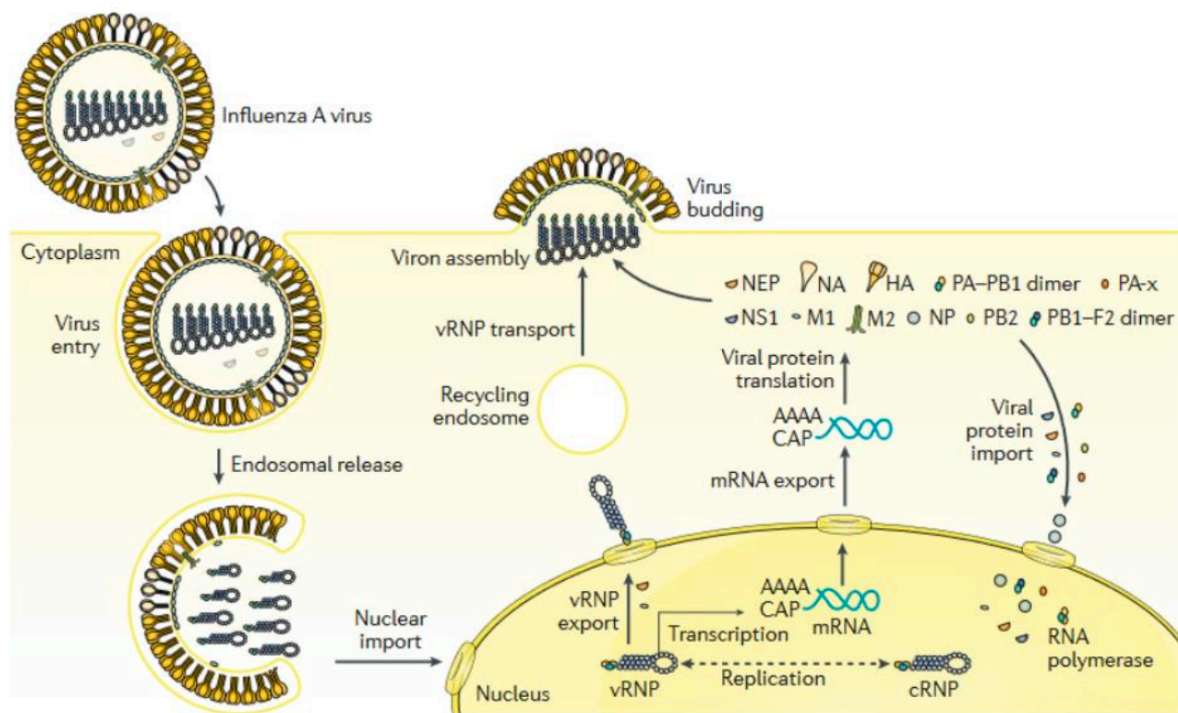


Figure 5 : Cycle de vie des virus influenza (Krammer et al. 2018)

Attachement à la cellule hôte

Dans un premier temps, le virus se lie aux récepteurs acides sialiques des cellules hôtes par l'intermédiaire de glycoprotéines de surface HEF (94).

Entrée dans la cellule hôte par fusion de l'endosome et de la membrane virale

Dès son attachement, l'HEF est transformé, par protéolyse, en HEF1 et HEF2 présentant chacun un peptide de fusion partiellement exposé. Celui-ci ne s'insère pas dans la cavité de la cellule hôte (125). Les mécanismes exacts n'ont pas encore été démontrés pour l'IDV, mais une forte hypothèse suggère (comme les autres virus grippaux) que le virus utilise la voie d'endocytose.

Une première internalisation du virus a alors lieu dans un compartiment, appelé endosome.

Le pH de l'endosome va ensuite s'acidifier entraînant des changements de conformation des hémagglutinines. Ce mécanisme va favoriser la fusion des deux membranes, celle qui enveloppe le virus et celle de l'endosome (126).

Parallèlement, une protéine membranaire nommée M2, est une viroporine qui crée un canal ionique, permettant le passage de protons H^+ de l'intérieur de l'endosome vers l'intérieur du virus. Le but est de dissocier le complexe ribonucléoprotéique (RNP) des autres composants du virus, et de les libérer dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ce complexe RNP joue un rôle primordial dans les mécanismes de transcription, de régulation post-transcriptionnelle et dans la traduction du virus (15).

Importation nucléaire des complexes ribonucléoprotéiques

L'importation des RNP dans le noyau de la cellule hôte se réalise par un processus actif reposant sur des signaux de localisation nucléaire (NLS) et des protéines d'import. De même, les protéines virales nécessaires pour la réplication du virus sont importées via le même procédé (127).

Synthèse de l'ARN viral : Transcription et Réplication

Une fois dans le noyau de la cellule hôte, la synthèse de l'ARN viral peut débuter. Les deux étapes indispensables sont : la transcription et la réplication.

La première étape commence par la transcription d'un ARN messager (ARNm) de polarité positive, coiffé et polyadénylé, qui présente une copie incomplète de l'ARN viral (ARNv).

L'ARN-polymérase II, enzyme responsable du processus de transcription, va ensuite débiter la transcription de l'ARNm par l'extrémité 3' vers 5'.

Les différents segments d'ARNm vont subir des phénomènes d'épissage alternatif permettant d'obtenir, à partir d'une même séquence génomique, plusieurs ARNm correspondants à des protéines distinctes nécessaires pour le bon fonctionnement du virus (128).

La seconde étape de la synthèse de l'ARN viral est la réplication. Ce processus se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, il y a la synthèse d'un brin d'ARN de polarité positive, complémentaire du brin d'ARNv (ARNc). Dans un second temps, l'ARNc est répliqué en ARNv de polarité négative cette fois, identique au brin d'ARNv initial (128).

Exportation nucléaire des ribonucléotides vers le cytoplasme de la cellule hôte

Grâce à la protéine de matrice M1 et la protéine d'export nucléaire (NEP) du virus, les complexes RNP sont exportés du noyau de la cellule hôte vers son cytoplasme. Dans un second temps, seuls les brins d'ARNv, de polarité négative, sortent (129).

Assemblage du virus

Dans le cytoplasme de la cellule hôte, les protéines de la membrane du virus sont synthétisées sur des ribosomes. Ces protéines sont ensuite déplacées dans le réticulum endoplasmique où elles prennent leur forme finale, glycosylées et associées en polymères. Elles sont ensuite dirigées vers l'appareil de Golgi afin de subir les dernières transformations fondamentales à leur action. C'est le processus de maturation post-traductionnelle. Pour finir, elles sont acheminées vers le site d'assemblage des virus, dans le pôle apical de la cellule hôte (130).

Empaquetage du génome viral

Afin d'obtenir un virus fonctionnel infectieux, il est indispensable que tous les segments du génome viral soient présents lors du processus d'empaquetage.

Deux hypothèses sont avancées afin de décrire ce mécanisme. Le premier modèle est dit aléatoire et le second est un modèle d'empaquetage spécifique des segments

d'ARN. Cela serait possible par la présence de signaux d'encapsulation sur des régions codantes et non-codantes des segments de l'ARNv (130).

Bourgeoisement du virus

Les virus sont ensuite formés par bourgeoisement permettant leur libération de la cellule hôte.

Les glycoprotéines de surface, la protéine M2, et une accumulation de la protéine M1 se retrouvent vers le pôle apical de la cellule hôte. Cette accumulation entraîne une courbure de la membrane plasmique accompagnée d'une fusion de la membrane à la base de la particule bourgeoisante. Les liaisons entre glycoprotéines et acides sialiques sont ensuite rompus par l'HEF (même protéine qui a permis l'entrée du virus dans la cellule au début de son cycle), ce qui permet d'expulser le virus nouvellement formé (15).

L'enveloppe finale du virus est composée de la membrane plasmique de la cellule hôte (130).

Ainsi, les virus néoformés sont libérés et prêts à infecter de nouvelles cellules hôtes afin de propager l'infection.

3. Pathogénicité IDV : ce que l'on sait pour l'instant

Nous allons, maintenant, nous intéresser à la pathogénicité de ce virus chez les bovins et son rôle dans l'apparition des BPI.

En effet, l'isolement de l'IDV a été décrit chez des bovins malades mais aussi chez des bovins sains. Majoritairement, les bovins malades positifs à ce virus grippal présentaient aussi des résultats positifs à d'autres agents pathogènes respiratoires. Ce point est une limite afin de comprendre la pathogénicité de ce virus seul chez l'hôte (64).

a. La pathogénicité lors d'une infection par le virus Influenza D

Lors d'une étude expérimentale, Ferguson *et al.* (2016), ont voulu comprendre la pathogénèse et la transmission de l'IDV lors d'une infection expérimentale sur des veaux de 4 mois (131).

Dans un premier temps, ils ont utilisé trois veaux mâles qu'ils ont mis dans trois enclos différents. Ils les ont infectés par voie intranasale avec le virus IDV. Ils ont ensuite ajouté un veau séronégatif, dit veau de contact, par enclos afin de voir si le virus inoculé sur les premiers veaux pouvait infecter les nouveaux veaux.

A partir de 9 jours, tous les veaux (infectés et de contacts) étaient positifs aux anticorps anti-IDV. Tous les animaux présentaient également une excrétion virale dans les écouillons nasaux et des signes cliniques plus ou moins forts.

Ce premier résultat indique que la transmission entre veaux par contact direct est fort probable dans un élevage bovin.

Afin d'imiter la transmission zoonotique, ils ont également utilisé deux furets, qu'ils ont exposés à un jouet en plastique imbibé d'écoulements nasaux infectés provenant des veaux inoculés. Les furets n'ont pas excrété le virus et n'ont pas séro-converti. Ce second résultat suggère que la transmission du virus entre les bovins et les furets n'est pas possible. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les bovins constituent un réservoir naturel pour l'IDV.

Une seconde étude réalisée par Salem *et al.* (2019), a permis d'expliquer la pathogénicité de l'IDV chez des veaux naïfs privés de colostrum, ainsi que la capacité de ce virus à être transmis par voie aérienne (105).

Dans un premier temps, huit veaux naïfs ont été infectés par inhalation d'aérosols contaminés avec l'IDV. Ils ont ensuite mis trois veaux de contact indirect dans des enclos à 3 mètres des veaux préalablement infectés. Aucun contact direct n'était possible.

Pour les huit premiers veaux, il a été montré que l'IDV s'est répliqué à la fois dans les voies respiratoires supérieures et inférieures, et les signes cliniques ont commencé 4 jours après l'inoculation. 10 jours après l'infection, les huit veaux étaient séropositifs à l'IDV.

Lors de l'examen virologique des trois veaux de contact indirect, il a été démontré qu'ils ont également été positifs à l'IDV. Ce résultat suggère qu'une transmission par les aérosols est possible sur de courtes distances. De plus, des échantillons d'air prélevés dans différentes zones de la stabulation sont également revenus positifs lors de la recherche du virus.

Ainsi, la conclusion de ces expériences est que l'IDV est un virus respiratoire ayant une pathogénicité modérée avec des signes cliniques plus ou moins graves, et un pouvoir de transmission assez fort. Ainsi, l'IDV peut donc être considéré comme un facteur de prédisposition ou un cofacteur de maladie respiratoire, fragilisant l'hôte et son appareil respiratoire, facilitant l'infection par d'autres virus ou bactéries.

b. La pathogénicité lors d'une co-infection

i. Co-infection entre IDV et les bactéries

Il a déjà été établi que les co-infections entre virus et bactéries sont très fréquentes lors de BPI chez les bovins. En effet, leurs interactions font intervenir principalement deux mécanismes : la destruction de l'épithélium respiratoire par un virus, ce qui expose la membrane basale aux infections par les bactéries ; ou le dysfonctionnement du système immunitaire, qui va favoriser la prolifération bactérienne (132).

Les recherches actuelles cherchent à savoir si l'infection par IDV peut aggraver les signes respiratoires en cas de co-infection, comme peut le faire les virus BRSV ou BPI3.

Lors d'une première recherche expérimentale, datant de 2019, plusieurs groupes de veaux, âgés de 4 à 6 mois, ont été infectés avec IDV et/ou *M. haemolytica*, et leurs scores cliniques ont été comparés, afin de déterminer s'il y a une influence de la co-infection. Un premier groupe a été infecté par IDV à J0 et par *M. haemolytica* 5 jours après ; un second groupe n'a eu que IDV, un troisième groupe n'a été infecté que par *M. haemolytica*, et un dernier groupe a été utilisé en tant que témoin (non infecté).

Pour les veaux du premier et du second groupe, les scores cliniques étaient similaires sans différences significatives. Le groupe de veaux infectés seulement avec *M. haemolytica*, présentaient des lésions pulmonaires et des signes cliniques. Ce résultat suggère que la primo-infection par IDV et *M. haemolytica* n'augmente pas la maladie lorsque la co-infection est proche (5 jours entre les deux infections). Ainsi, la synergie entre ce virus et cette bactérie ne modifie pas la pathologie respiratoire chez les veaux (133).

Une autre étude, datant de 2021, cherche à connaître l'influence de la co-infection IDV/*M. bovis* sur les BPI.

Tout comme la première étude, plusieurs veaux âgés de 6 semaines ont été divisés en différents groupes. Un premier groupe présentant des veaux infectés par IDV seul, un second groupe infecté par *M. bovis* seul, un troisième groupe coinfectés simultanément avec IDV et *M. bovis* et un dernier groupe témoin non infecté.

Lors de l'étude, le groupe infecté par *M. bovis* seul a présenté des signes cliniques de trachéobronchite modérés, mais pas de BPI sévère ni de lésions typiques de l'infection par cette bactérie. Le groupe infecté uniquement par IDV a montré, lui, des signes cliniques modérés, identiques à ceux déjà observés par Salem *et al.* (2019). Par contre la co-infection s'est traduite par une période d'incubation plus courte et des signes cliniques statistiquement plus sévères ainsi qu'une gravité accrue des lésions macroscopiques et microscopiques de la trachée et des poumons. Les auteurs suggèrent que IDV pourrait faciliter et potentialiser l'effet clinique de *M. bovis* (102). Notamment la co-infection était associée à une production très importante d'interféron gamma dans les lavages broncho-alvéolaires des veaux coinfectés, qui pourrait expliquer la sévérité de la maladie.

Ces études entre IDV et ces deux bactéries suggèrent que la co-infection peut dépendre de nombreux facteurs tels que la nature des animaux (âge, statut immunitaire), de la nature et de la quantité des agents pathogènes, de la séquence d'infections (co-infection réelle versus primo-infection, délais entre deux infections successives) et de l'environnement.

ii. Co-infection entre IDV et les autres virus

Les données concernant une potentielle co-infection entre l'IDV et des virus spécifiques sont très faibles. En effet, les études de synergie entre virus sont déjà moins connues que les synergies entre virus et bactéries. Beaucoup d'études montrent la présence de nombreux agents pathogènes (notamment plusieurs virus) dans les prélèvements de BPI, mais la compréhension spécifique de leur interaction est encore peu connue.

Par exemple, une recherche datant de 2021 a voulu étudier la présence de l'IDV entre 2017 et 2020 sur 883 échantillons naseaux de bovins présentant des signes respiratoires au Canada. Ils ont également été testés par PCR pour les autres grands virus responsables des BPI (IBR, BVDV, BRSV, BPI3 et BCoV). Il a été déterminé qu'un résultat positif à l'IDV était significativement associé à un résultat positif pour le BRSV (64).

Ainsi, malgré une forte probabilité de trouver sur le terrain l'IDV associé à d'autres virus, de nombreuses recherches doivent être encore effectuées afin de mieux comprendre leur dynamique de contamination.

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Objectifs

Notre étude expérimentale fait partie du projet PREVENTER, qui a notamment pour objectif d'étudier la circulation de l'IDV dans la population bovine. Ce projet est réalisé à l'échelle européenne, plus particulièrement en France, Italie, Belgique, Suisse et Turquie. Durant 18 mois, de décembre 2021 à août 2023, notre équipe a réalisé différents prélèvements sur le terrain, et différentes analyses en laboratoire, sur des populations de vaches laitières et de veaux de boucherie. Le but était d'évaluer l'émergence de l'IDV, sa circulation en France, son rôle dans le complexe des maladies respiratoires des bovins et le risque qu'il peut représenter pour l'homme. À la fin du projet, les résultats de chaque pays seront regroupés, permettant de mieux comprendre le virus et sa circulation en Europe, afin d'élaborer des stratégies de lutte en cas d'émergence virale.

L'étude expérimentale que nous avons réalisée dans le cadre de cette thèse, se limite à la détection directe de virus et de bactéries, dont l'IDV, chez les vaches laitières en France durant deux ans. L'objectif est d'évaluer la circulation et les associations des différents agents pathogènes respiratoires dans la population, à différents stades de vie du bovin. Les résultats virologiques ont été mis en relation avec les données cliniques recueillies lors des prélèvements afin de connaître l'état clinique des bovins en fonction des agents infectieux présents dans leurs voies respiratoires supérieures. Pour terminer, nous avons utilisé les données obtenues en virologie et en sérologie afin de connaître la fréquence d'apparition de l'IDV et son impact dans les élevages étudiés.

II. Matériel et Méthodes

1. Échantillonnage

a. Exploitations

Les prélèvements ont été réalisés dans trois élevages laitiers Prim' Holstein pendant une période allant d'un an à deux ans.

La première exploitation (E1), se situe en Haute-Garonne, elle a été suivie durant deux années consécutives. Les deux autres exploitations (E2, E3), respectivement dans le Lot-et-Garonne et en Ariège, ont été étudiées pendant une année.

Ces trois exploitations ont été préalablement sélectionnées car elles sont connues et suivies par l'ENVIT pour d'autres pathologies. D'autre part, elles présentent fréquemment des pathologies respiratoires au sein de leur exploitation.

De plus, dans l'exploitation E1 des analyses sérologiques préliminaires sur des vaches adultes avaient confirmé la présence d'une réponse sérologique à l'IDV ; et donc sa circulation possible.

b. Fréquence des prélèvements

Le choix de la fréquence des prélèvements a été décidé par le partenaire italien du projet PREVENTER (Annexe 1). En effet, le protocole dépend en partie de l'apparition de signes cliniques respiratoires lors des premiers prélèvements. Si durant l'année d'étude, les bovins ne présentent pas de signes respiratoires, les prélèvements auront lieu uniquement en début et en fin d'année.

Si par contre, certains bovins présentent des signes respiratoires (comme de la toux, du jetage, une dyspnée...), l'éleveur doit nous contacter pour prélever le groupe de bovins atteints, en plus des bovins déjà étudiés.

L'objectif est donc de faire les prélèvements au minimum deux fois dans l'année, et plus s'il y a des cas respiratoires, afin de suivre au maximum les agents pathogènes dans l'élevage.

La figure 5 permet d'illustrer les périodes de prélèvements dans les trois exploitations.

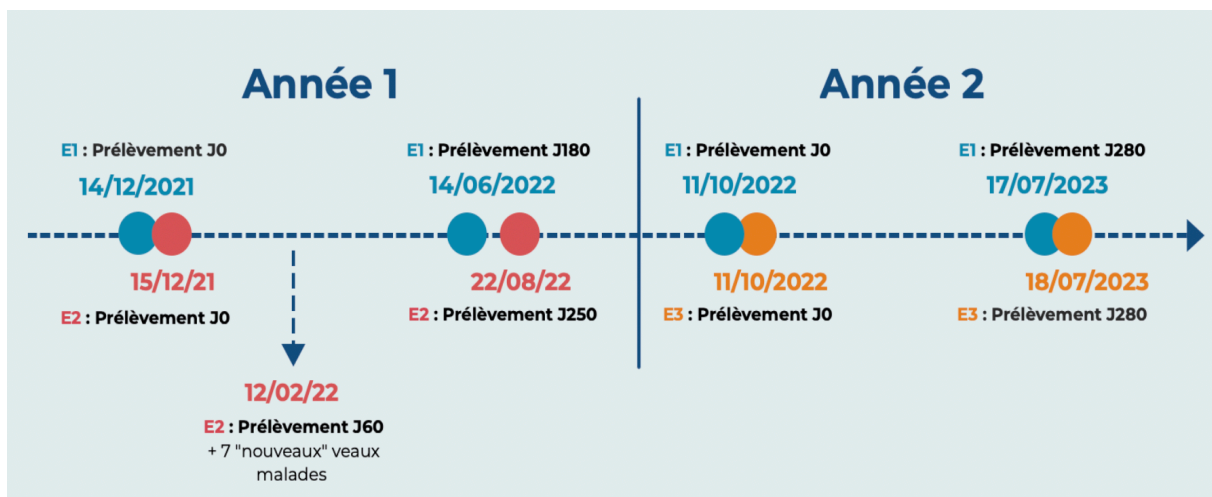


Figure 6 : Dates de prélèvements des trois exploitations de vaches laitières

Le début de l'année 1 a commencé le 14/12/2021 pour l'exploitation E1 et le 15/12/2021 pour l'exploitation E2. Suite à ces premiers prélèvements, seule l'exploitation E2 a présenté, en février, des bovins avec des signes respiratoires, surtout chez les veaux.

Ainsi, un groupe de sept « nouveaux » veaux présentant des signes cliniques (non inclus dans l'échantillonnage de départ), ont été prélevés le 12/02/22, pour suivre leurs évolutions au cours de l'année restante.

L'année 1 s'est terminée par des prélèvements le 14/06/2022 pour E1 et le 22/08/2022 pour E2 sans cas de pathologie respiratoire. Le retard dans la date des prélèvements pour E2 est dû à des raisons techniques liées à l'élevage.

Pour des raisons logistiques (temps de trajet, disponibilité de l'éleveur...) et techniques (absence de systèmes de contention des bovins), l'exploitation E2 a été remplacée par une nouvelle exploitation E3 pour l'année 2. L'exploitation E1 a été, à nouveau, prélevée durant cette deuxième année.

L'année 2 a débuté par des prélèvements le 11/10/2022 pour les deux exploitations E1 et E3. Aucune exploitation n'a présenté de pathologies respiratoires durant l'année 2. Seulement des prélèvements en début et en fin d'année ont été réalisés. La fin de l'année 2 se termine en juillet pour les deux exploitations E1 et E3.

c. Bovins prélevés

Parmi les 137 bovins présents dans l'exploitation E1, les 380 bovins de l'exploitation E2, et les 157 bovins de l'exploitation E3, uniquement 32 animaux par fermes, ont été analysés. En effet, quatre groupes de différents âges ont été choisis dans chaque ferme, permettant de représenter au maximum la population animale de l'exploitation. Un groupe de veaux (âgés de 1 à 2 mois), un groupe de génisses (âgés de 6 à 11 mois), un groupe de vaches laitières et un groupe de vaches taries. Chaque groupe comptait initialement 8 bovins.

Le choix des 8 bovins prélevés a été réalisé en fonction de la présence ou non de signes cliniques respiratoires dans la population le jour du prélèvement.

Si aucun signe clinique n'était observé lors des prélèvements, les échantillons étaient prélevés de manière aléatoire. Cependant, si des signes cliniques étaient observés à J0, le groupe était divisé en 2 (lorsque cela était possible), avec 4 bovins ayant des signes cliniques et 4 bovins sains.

Au début de l'année des prélèvements, il y avait 32 bovins choisis par exploitation. Cependant, comme les prélèvements ont été étalés sur une année entière, les groupes du départ ont évolué. En effet, certaines vaches laitières finissent leur lactation et deviennent des vaches taries. L'objectif était de garder toujours le même nombre de prélèvements et continuer à analyser les mêmes bovins afin de pouvoir les suivre tout au long de l'année. Ainsi, les vaches taries passant en lactation sont toujours considérées dans notre échantillonnage comme « vache tarie ».

Dans certains cas, des vaches ou des veaux présentant des pathologies n'ont pas survécu jusqu'à la fin de l'étude ou ont été réformés, modifiant ainsi le nombre d'échantillons à la fin de l'année. Également, certains bovins étaient mis au pâturage au moment de notre venue ce qui a empêché de faire les prélèvements à la fin de l'année.

Concernant l'exploitation E1, celle-ci a été prélevée sur deux années consécutives. Nous avons essayé de prélever au maximum les mêmes bovins entre l'année 1 et l'année 2 afin d'avoir un suivi sur deux ans. Ainsi, les génisses de l'année 2 sont les

veaux de l'année 1. Concernant les vaches en lactation et les vaches tarées, sur les 16 bovins adultes de l'année 2, 9 avait déjà été prélevé lors de l'année 1.

En bilan, un total de 280 prélèvements a été réalisé, dont 72 veaux, 67 génisses, 60 vaches tarées, 67 vaches en lactation et 14 prélèvements supplémentaires chez des veaux.

Le tableau 2 synthétise les données sur les bovins prélevés dans l'exploitation E1, E2 et E3.

Aucun animal n'a été vacciné contre les pathologies respiratoires ni pris de traitement antibiotique durant l'étude.

Tableau 2 : Récapitulatif de la population de bovins prélevés

	E1				E2			E3	
	J0	J180	J0	J270	J0	J60	J370	J0	J280
Année	1	1	2	2	1	1	1	1	1
Veaux	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Génisses	8	8	8	3	8	8	8	8	8
Vaches Tarées	8	5	8	7	8	5	5	8	6
Vaches en Lactation	8	8	8	7	8	7	5	8	8
Nouveaux veaux Ajoutés dans l'année en cours						7	7		
Total bovins	32	29	32	25	32	35	33	32	30

2. Score clinique

Lorsqu'un bovin présentait un signe clinique respiratoire (toux, jetage, dyspnée) ou une atteinte générale, un score clinique a été réalisé grâce à des critères spécifiques (tableau 3). Plusieurs symptômes comme de la toux, la présence de jetage, la température rectale, la fréquence respiratoire, le comportement alimentaire ou le comportement général, étaient évalués pour donner une note, appelée score clinique. Le score maximal étant 21, le seuil de 3 a été fixé pour définir qu'un animal était malade.

Il n'était pas possible de réaliser le score clinique pour tous les animaux prélevés, par manque de temps et de main d'œuvre. Lorsqu'un animal présentait de la toux, nous

avons réalisé le score clinique. Sinon, nous avons considéré l'animal comme étant sain et il n'y a pas eu de score clinique calculé dans le détail.

Tableau 3 : Grille de score utilisée pour établir le score clinique si un bovin présentait des symptômes respiratoires

SCORE CLINIQUE								
Symptômes	Note associée	Symptômes	Note associée	Symptômes	Note associée	Symptômes	Note associée	
Température		Toux		Dyspnée		Refus alimentaire		
< 39°C	0	Fréquence	Absence	0	Absente	0	Absent	0
39-40°C	1		Modérée	1	Présente	2	Partiel	1
40-40,9°C	2		Fréquente	2	Bruits respiratoires		Total	2
< 41°C	3	Intensité	Absente	0	Normaux	0	Score de comportement	
Fréquence respiratoire			Modérée	1	Renforcés	1	Normal	0
<35 mpm	0		Forte	2	Renforcés et supplémentaires	2	Leger abattement	1
35-40 mpm	1	Écoulement nasal		Très abattu/ décubitus			2	
40-60 mpm	2	Absent	0					
60-80 mpm	3	Séro-muqueux	1					
> 80 mpm	4	Muco purulent	2					

3. Réalisation des prélèvements

Un écouvillon nasal profond (EN) par narine ainsi que deux prélèvements sanguins sur tube sec (PS) ont systématiquement été effectués sur tous les bovins sélectionnés.

a. Écouvillons nasaux profond

Afin d'obtenir les virus et bactéries présents dans l'appareil respiratoire superficiel, deux EN ont été faits par animal.

L'EN a été effectué avec un écouvillon stérile de 20 cm contenant un embout en coton et un manche en plastique (évitant la casse ou une blessure de l'animal).

Pour les veaux, la contention physique, à deux personnes, de l'animal suffisait pour réaliser les EN. Concernant les adultes et les génisses, la contention se passait au cornadis, empêchant ainsi le bovin de reculer, en bloquant la tête vers le bas pour faciliter l'introduction de l'écouvillon dans la narine.

Le premier écouvillon était introduit dans la narine droite vers le méat dorsal, le plus loin possible, puis frotté contre la muqueuse nasale jusqu'à la rosée sanguine pendant cinq secondes minimum.

L'écouvillon, une fois sorti de l'animal, était coupé et mis dans un tube Eppendorf afin de collecter seulement l'extrémité du coton. Le tube Eppendorf était préalablement rempli de 1mL de PBS (une solution tampon Phosphate Buffered Saline) stérile.

Le même protocole était réalisé pour le second écouvillon dans la narine gauche.

Lors du transport jusqu'à l'école ENVT, les écouvillons étaient conservés au froid dans une glacière puis mis au congélateur à -80°C dans l'attente d'être analysés.

b. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été pratiqués sur la veine jugulaire pour les veaux, et sur la veine coccygienne pour les adultes et les génisses.

Le sang a été prélevé avec une aiguille Venoject® Terumo® de 20G 0,9 x 25mm et un vacutainer Venosafe® Holder Terumo®, puis collecté dans des tubes secs de 5mL.

Deux tubes secs, contenant un activateur de coagulation, ont été réalisés par animal. L'activateur de coagulation assure une coagulation rapide et uniforme pour un meilleur rendement en sérum après centrifugation.

Environ 3 à 4mL de sang ont été prélevés dans chaque tube.

Après avoir effectué les prises de sang, les tubes secs sont conservés au froid positif dans une glacière jusqu'au retour à l'école ENVT.

Une fois au laboratoire, deux protocoles permettant de récupérer le sérum ont été réalisés selon les contraintes de temps disponibles. On peut placer les tubes à 37°C pendant 1 à 2 heures puis centrifuger à 2500 rpm pendant 10 minutes et récupérer le sérum. Sinon, il est possible de laisser les tubes à température ambiante toute la nuit et centrifuger à 2500rpm le lendemain matin, durant 10 minutes, puis récolter le sérum. Le choix du protocole de récolte du sérum se réalise en fonction de l'heure d'arrivée à l'ENVT, après avoir réalisé les prélèvements dans les fermes.

Les échantillons sont ensuite conservés dans un congélateur à – 20°C dans l'attente de l'analyse.

4. Réalisation des analyses

a. Analyses des écouvillons nasaux par q-PCR

Pour chaque prélèvement, la recherche des virus IDV, BCoV, BRSV, BPI3 et des bactéries *P. multocida*, *H. somni* et *M. bovis* a été effectué. Pour cela, nous avons procédé à des réactions en chaîne par polymérase, quantitative en temps réel (q-PCR).

La q-PCR utilisée est une technique sensible et précise, qui utilise des marqueurs fluorescents (SYBR green et Taqman) afin de détecter et d'évaluer de manière indirecte la quantité d'ADN ou d'ARN amplifiés. La particularité de cette méthode est que la quantification a lieu en temps réel, permettant ainsi d'obtenir à chaque cycle la quantité d'amplicon tout au long de la réaction.

Cette analyse permet donc, de déterminer la présence ou non ainsi que la quantité d'agents pathogènes dans les voies respiratoires supérieures des bovins prélevés.

Seuls les écouvillons des narines gauches ont été utilisés pour la q-PCR. Les écouvillons des narines droites ont été gardés pour des études ultérieures, notamment s'il y a besoin d'isoler un agent pathogène.

i. Extraction de l'ARN ou de l'ADN viral et bactérien

Afin de procéder à la q-PCR, il faut, dans un premier temps, extraire l'ARN ou l'ADN, viral ou bactérien des écouvillons mis préalablement dans des tubes Eppendorf avec 1mL de PBS à -80°C.

Chaque tube est donc décongelé sur glace, évitant ainsi un choc thermique qui pourrait dégrader le matériel génétique des agents pathogènes.

Une fois l'échantillon complètement décongelé, il faut bien homogénéiser le tube puis récupérer le surnageant pour l'extraction.

La procédure d'extraction se fait avec le kit NucleoMag® RNA/DNA couplé d'un robot extracteur Pharma KingFisher™ Flex 96 Deep-Well Magnetic Particle Processor (Thermo Scientific). Ce protocole automatisé utilise des billes magnétiques permettant l'adsorption et donc l'isolement de l'ARN et de l'ADN.

Dans un premier temps, chaque échantillon est incubé avec 180µL d'une solution Lysis Buffer NPL1 et 4µL de Carrier RNA contenant des ions chaotropes afin de provoquer la lyse de tout matériel présent dans l'échantillon. Le lysat est ensuite récupéré afin d'ajouter 240µL de billes magnétiques NucleoMag® B et 600µL de Binding Buffer NPB2 permettant la liaison des acides nucléiques aux billes.

Après séparation magnétique, les billes sont lavées à l'aide de 600µL de tampons de lavage NPW3, NPW4 dans le but d'éliminer les contaminants et les sels. Un rinçage à l'éthanol 80 % est également effectué afin de supprimer les solutions tampon. L'éthanol résiduel s'évapore ensuite par séchage à l'air libre.

Un témoin négatif est réalisé en même temps afin de vérifier que le kit n'est pas contaminé.

Enfin, l'ARN et l'ADN hautement purs sont libérés des billes avec 80µL de tampon d'élution à faible teneur en sel. L'ARN et l'ADN purifiés peuvent ensuite être directement utilisés pour l'amplification par q-PCR.

ii. Amplification de l'ARN viral ou de l'ADN bactérien par q-PCR

Pour analyser le matériel génétique présent dans les échantillons, il faut l'amplifier par q-PCR. Cette technique utilise un programme de plusieurs cycles identiques à différentes températures permettant d'amplifier et d'observer l'amplicon, grâce à des amorces, des marqueurs fluorescents, une ADN ou ARN polymérase et des nucléotides. Le tout se déroule dans une solution tampon afin d'optimiser les conditions de salinité et de pH pour la réaction.

Les amorces utilisées sont préalablement dessinées, sur la base de séquences génomiques des agents pathogènes déjà séquencés lors d'études antérieures.

La technique de la q-PCR est basée sur une succession de cycle divisé en trois étapes principales : la dénaturation, l'hybridation amorce/ADN ou ARN et l'élongation. Chaque étape est réalisée à une température précise qui est définie dans le protocole utilisé. La réaction se déroule dans un thermocycleur qui va modifier automatiquement ces températures.

En fonction de l'agent pathogène recherché, deux méthodes ont été pratiquées pour détecter le processus d'amplification : la q-PCR SYBR Green et la q-PCR Taqman. SYBR Green est une méthode basée sur un colorant d'acide nucléique qui va devenir fluorescent lorsqu'il est lié aux acides nucléiques. Taqman est une méthode basée sur des sondes d'hydrolyse doublement marquées dont l'amplification sera détectée par sa dégradation par la Taq polymérase, ce qui provoquera la libération du fluorophore. Ces deux techniques sont conçues pour générer une fluorescence pendant la q-PCR, ce qui permet de surveiller la réaction en continu. (Figure 6)

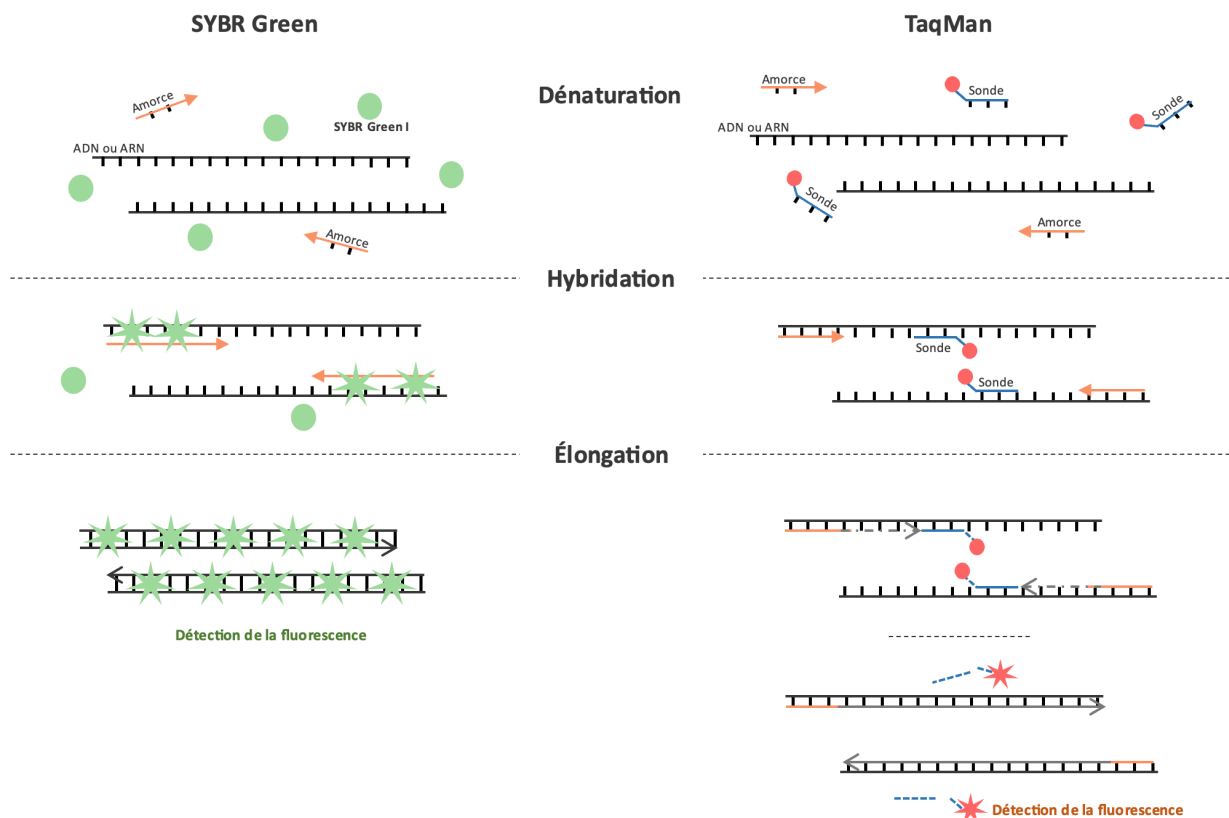


Figure 7 : Schéma de la méthode SYBR Green et TaqMan

La méthode Taqman a été utilisée pour la recherche de IDV, BRSV, BPI3, *M. bovis*, *H. somni* et *P. multocida*. Tandis que la seconde méthode, SYBR Green, a été effectuée pour la détection du virus BCoV. Nous avons utilisé cette seconde méthode pour BCoV car le kit optimisé était déjà présent au laboratoire de l'ENVT.

Pour *M. haemolytica*, le protocole n'était pas optimisé lors de la réalisation des analyses. Le kit et les amorces étaient inutilisables. Ainsi, nous n'avons pas pu faire la recherche de cette bactérie dans nos échantillons.

Le protocole de détection des agents pathogènes IDV, BRSV, BPI3, *H. somni* et *P. multocida* est réalisé par la méthode Taqman en utilisant le kit One Step RT-PCR (Qiagen). Différentes amorces et sondes ont été sélectionnées, en amont, en fonction du virus ou de la bactérie recherchée. Le tableau 4 indique les différentes amorces en fonction de l'agent pathogène. Un volume final de 10 μ L a été préparé avec en 2,1 μ L d'eau, 5 μ L de Master Mix, 0,1 μ L de Rt mix, 0,8 μ L d'amorce sens et 0,8 μ L d'amorce antisens (concentration de 10 μ M), 0,2 μ L de Sonde et 1 μ L d'ARN (quantité pour un échantillon).

Les protocoles d'amplification ont été réalisés, comme suit, par une préparation de 10 minutes à 45°C, puis 5 minutes à 95°C.

L'amplification a été réalisée en 40 cycles de deux étapes : 5 secondes à 95°C pour la dénaturation, puis 30 secondes à 60°C pour hybrider les amorces sur les séquences spécifiques et procéder à l'élongation.

Pour la bactérie *M. bovis*, la méthode Taqman a été réalisée, cette fois-ci, avec le kit Quantinova Probe PCR (Qiagen). Les amorces sélectionnées sont également présentes dans le tableau 4. Pour cette bactérie, un volume final de 10 μ L a été préparé avec en 3 μ L d'eau, 5 μ L de Master Mix, 0,4 μ L d'amorce sens et 0,4 μ L d'amorce antisens (concentration de 10 μ M), 0,2 μ L de Sonde et 1 μ L d'ADN (quantité pour un échantillon).

Le protocole d'amplification débute par une préincubation de 2 min à 95°C puis 40 cycles de deux étapes combinées de 5 secondes à 95°C et puis 5 secondes à 60°C.

Pour finir, le protocole de détection des virus BCoV par la méthode SYBR Green est réalisé grâce au kit iTaq™ Universal SYBR Green One-Step (Biorad). Les amorces utilisées sont présentes dans le tableau 4. Cette méthode utilise un volume final de 10µL, qui a été préparée avec en 3,375µL d'eau, 5µL de tampon iTap mix, 0,125µL de iScript enzyme, 0,25µL d'amorce sens et 0,25µL d'amorce antisens (concentration de 10µM) et 1µL d'ARN (quantité pour un échantillon).

Le protocole d'amplification a été réalisé, comme suit, par 10 minutes à 50°C pour la rétrotranscription d'ARN, puis 60 secondes à 95°C.

L'amplification a été réalisée en 40 cycles de deux étapes : 15 secondes à 95°C pour la dénaturation, puis 40 secondes à 60°C pour hybrider les amorces sur les séquences spécifiques et débiter l'élongation.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées lors des q-PCR

Agents pathogènes	Amorce sens	Amorce antisens	Amorce sonde	Références amorces
IDV <i>Taqman</i>	5'- GCT GTT TGC AAG TTG ATG GG -3'	5'- TGA AAG CAG GTA ACT CCA AGG -3'	5'- TTC AGG CAA GCA CCC GTA GGA TT -3'	<i>Hause et al., 2013</i>
BCoV <i>SYBR Green</i>	5'- TGG ATC AAG ATT AGA GTT GGC -3'	5'- CCT TGT CCA TTC TTC TGA CC -3'		<i>Amer HM et al., 2011</i>
BRSV <i>Taqman</i>	5'- AAG GGT CAA ACA TCT GCT TAA CTA G -3'	5'- TCT GCC TGW GGG AAA AAA G -3'	5'- AGA GCC TGC ATT RTC ACA ATA CCA CC A -3'	<i>Hakhverdyan et al., 2005</i>
BPI3 <i>Taqman</i>	5'- CTT CCA CTC GAT AGA GGG ATA AA -3'	5'- GCA ATG ATA GCA AAG CCA TGA A -3'	5'- TGT GAA TTG TAC AGC GAT TGG ATC A - 3'	<i>Amorces dessinées sur la base de souches présente au laboratoire ENVT</i>
M. bovis <i>Taqman</i>	5'- TCA AGG AAC CCC ACC AGA T -3'	5'- AGG CAA AGT CAT TTC TAG GTG CAA -3'	5'- TGG CAA ACT TAC CTA TCG GTG ACC CT -3'	<i>Sachse et al., 2010</i>
P. multocida <i>Taqman</i>	5'- TCG AGT TGC AGA CTC CAA TCC - 3'	5'- GAG TGC GAG CTT GAG CGA AT -3'	5'- TCA GAA AGT GCA TCT AAG -3'	<i>Amorces dessinées sur la base de source présente au laboratoire ENVT</i>
H. somni <i>Taqman</i>	5'- CAG TGG GTG AAA TGG CTG-3'	5'- TTA CCG CTC TTT CTA CAC GGA CTA-3'	5'- ATC AAT TCC GCA TTG GT -3'	<i>Amorces dessinées sur la base de souches présente au laboratoire ENVT</i>

Une fois l'amplification terminée, une courbe de point de fusion est obtenue. Le but est de connaître le moment où la fluorescence est détectée par l'automate. La courbe détermine ainsi le cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles effectués avant la détection de l'amplicon.

A partir du moment où la valeur Ct est détectée, l'amplicon augmente exponentiellement.

Un témoin négatif, un témoin positif et un contrôle interne sont réalisés à chaque fois afin de vérifier l'absence de contamination du kit, et si le protocole fonctionne. Une gamme d'échantillons positifs est également faite afin de pouvoir comparer nos résultats d'échantillon positifs.

Durant cette étude, le but est de savoir quels sont les agents pathogènes présents dans les voies respiratoires supérieures des bovins et en quelle quantité relative. C'est pourquoi il est indispensable d'utiliser une analyse quantitative (comme la q-PCR) qui nous donnera des résultats chiffrés.

b. Analyse sérologique par IHA

La sérologie se base sur la recherche d'anticorps dans un sérum. En effet, lorsqu'un bovin est infecté par un agent pathogène, il va produire des anticorps. Pour les détecter, nous allons réaliser un test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA). Ce test est une méthode indirecte qui va quantifier les anticorps présents dans l'échantillon.

Un résultat positif certifie que le bovin a été infecté par le virus à un moment de sa vie et ainsi, certifie le passage du virus dans le cheptel.

Le but de notre analyse est donc de déterminer si les bovins prélevés présentent des anticorps anti-IDV.

i. Principe du test IHA

L'IHA se base sur la particularité qu'ont, certains virus, de présenter une protéine de surface appelée hémagglutinine. C'est une glycoprotéine présente chez les virus Influenza. Elle est capable de reconnaître, et de se fixer aux acides sialiques présents sur la membrane des globules rouges (GR). Ainsi, lorsque le virus de la grippe et les globules rouges sont mis en contact (dans des conditions spécifiques) on peut obtenir un complexe Virus-GR-Virus-GR qui forme une agglutination, parfois observable à l'œil nu.

Toutefois, en présence d'anticorps anti-Influenza, l'hémagglutinine du virus se fixera à l'anticorps et non aux globules rouges, qui resteront libres sans s'agglutiner.

Cette technique permet également de déterminer le titre d'anticorps sériques dans les échantillons. Pour cela, les sérums sont dilués en série, et une quantité connue de virus est rajoutée dans chaque dilution. La dilution la plus élevée dans laquelle l'IHA est complète correspond au titre d'anticorps du sérum.

ii. Choix de la souche du virus

Pour réaliser un test IHA, il faut, dans un premier temps, déterminer le virus à rechercher. La souche disponible utilisée pour la recherche d'IDV est D/bovine/France/5920/2014 (D/5920) car c'est une souche très présente en France. Elle a été isolée à partir d'un fragment de poumon d'un veau français atteint de bronchopneumonie (105).

iii. Étape de pré-traitement : traitement des sérums avec le produit « Cholera Filtrate »

Avant la réalisation de ce test, il est nécessaire de s'assurer que des inhibiteurs non-spécifiques, potentiellement présents dans le sérum, n'interfèrent pas avec la réaction d'hémagglutination. Ces inhibiteurs pourraient se lier aux hémagglutinines virales, et cela entraînerait une absence d'agglutination et fausserait l'interprétation finale (faux positif). De tels inhibiteurs peuvent être initialement présents dans le sérum sous forme de résidus d'acides sialiques.

Afin d'éviter ce type de réaction, un traitement à base de filtrat de choléra (ou « Cholera Filtrate » en anglais) est nécessaire. Le « Cholera Filtrate » est une neuraminidase. C'est une enzyme qui a le pouvoir de cliver et lyser les récepteurs des acides sialiques.

Ainsi, après avoir décongelé les sérums mis au congélateur à -20°C, le kit « Cholera Filtrate » est donc utilisé. Il faut ajouter 100µL de Cholera Filtrate dilué à 1 :20 dans 25µL de sérum à tester et incuber le mélange à 37°C pendant une nuit afin d'activer l'enzyme. Pour désactiver l'enzyme, il faut ajouter 100µL de Citrate de sodium à 1,5% et incuber à 56°C pendant 30 minutes. On obtient des sérums dépourvus d'inhibiteurs non-spécifiques.

iv. Hémabsorption des sérums

Cette étape permet d'éliminer les agglutinines non-spécifiques. S'il y a la présence d'agglutinines non spécifiques dans le sérum, elles se lieraient avec les anticorps et entrainerait une agglutination de l'échantillon alors qu'il y a la présence d'anticorps (faux négatif). Il faut donc les supprimer.

On ajoute 50µL de globule rouge de poulet à 20% dans les sérums, puis on incube 30 minutes à 4°C, en agitant de temps en temps. Cela va permettre de lier les agglutinines non-spécifiques avec les globules rouges pour qu'elles n'interfèrent plus. Pour finir, il faut récupérer le surnageant après 5 minutes de centrifugation à 3000rpm. Les sérums obtenus sont dilués à 1 :10.

Afin de vérifier que cette étape a fonctionné, il est important de tester les sérums. A cette étape, aucun échantillon ne doit s'agglutiner.

Pour les tester, on utilise une plaque P96, où l'on met 50µL de sérum et 50µL de globules rouges de poulet à 1% dans chaque puits. On incube pendant 30 minutes à 4°C. S'il n'y a pas de trace d'agglutination, on peut effectuer le test IHA, sinon on doit recommencer l'étape d'hémabsorption une seconde fois (cela signifie qu'il y a encore la présence d'agglutinines non-spécifiques).

v. Dilution des sérums

Une fois les échantillons prêts, on procède à la dilution des sérums S0 dans une microplaque P96 à fond conique.

30µL de PBS sont distribués dans les puits des lignes B à H et des colonnes 2 à 12. La première ligne (A) permet de commencer la dilution. Pour ce faire, 60µL de chaque sérum sont disposés dans la ligne 1, chaque colonne permet de tester un sérum. Des dilutions en série sont alors réalisées en prélevant à chaque fois 30µL de puit A vers le puit B, puis 30µL du puit B vers le puit C jusqu'au puit H. On obtient des dilutions en série au 1 :20.

Il est important de changer de cônes à chaque prélèvement afin de ne pas fausser la dilution.

vi. Test d'inhibition de l'hémagglutination avec le virus

On ajoute ensuite dans chaque puits 30µL de solution virale IDV/5920 de titre 4 UHA (préalablement préparé). Le mélange doit rester 30 minutes à température ambiante. Pour finir, 60µL de solution d'hématies de poulet 1% sont ajoutés dans tous les puits avant d'incuber le tout à 4°C pendant 45 minutes pour procéder à la lecture de la plaque.

Un témoin positif est également réalisé.

S'il y a présence d'anticorps anti-IDV/5920 dans le sérum, ils vont bloquer et entourer les virus, empêchant alors l'agglutination avec les globules rouges. Le résultat sera donc positif. En revanche, s'il n'y a pas d'anticorps anti-IDV/5920, il y aura une agglutination entre le virus ajouté et les globules rouges. Le résultat sera alors négatif. (Figure 7)

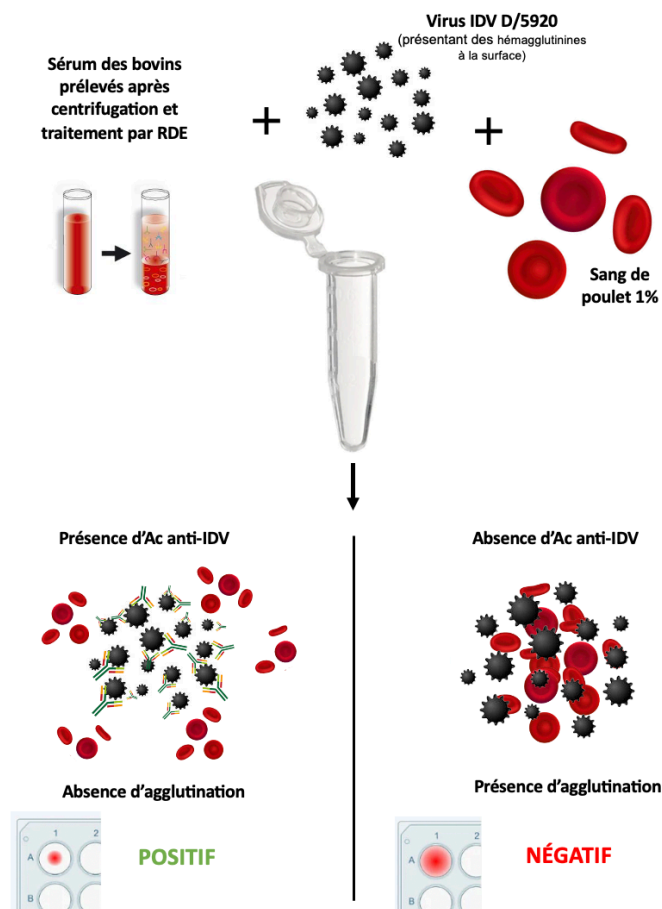


Figure 8 : Principe de l'inhibition par hémagglutination

III. Résultats

1. Fréquence des agents pathogènes respiratoires et co-infections

Les analyses q-PCR réalisées en virologie ont révélé la présence de certains agents pathogènes dans nos prélèvements. Certains ont été détectés seuls et d'autres en association. Les trois exploitations présentent des similitudes par rapport aux agents pathogènes identifiés.

a. Fréquence de détection des différents agents pathogènes respiratoires

i. Données globales pour les trois élevages laitiers étudiés

Dans les voies aériennes supérieures de tous les bovins prélevés par EN, le principal agent pathogène identifié est *P. multocida* avec une fréquence d'apparition de 69,3% (194 bovins positifs sur 280 au total). Le second agent pathogène le plus présent dans nos résultats, est *H. somni* avec une fréquence de 17,9% (50 sur 280 au total). Le troisième agent pathogène est *M. bovis* identifié dans 6,4% des bovins prélevés.

BCoV, BRSV et BPI3 sont retrouvés ponctuellement dans nos analyses avec une fréquence respective de 3,2%, 3,2% et 2,1%. (Figure 8)

Le virus IDV n'a jamais été détecté lors de nos prélèvements.

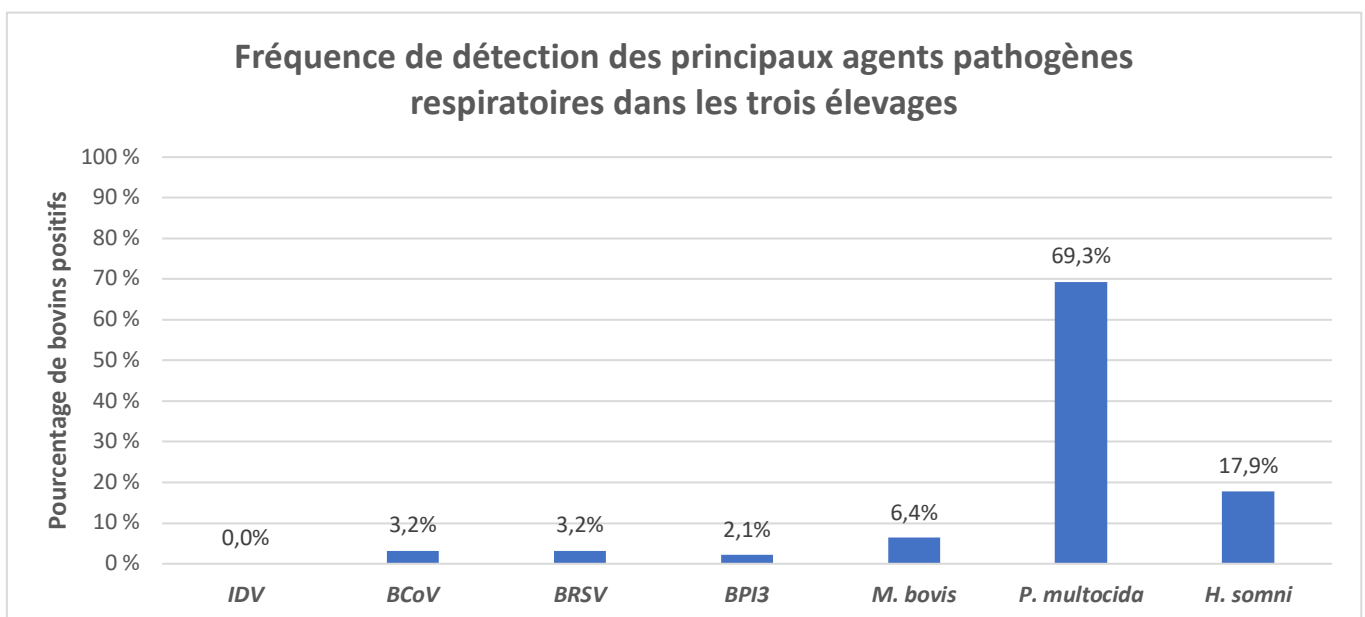


Figure 9 : Fréquence de détection des principaux agents pathogènes respiratoires dans les trois exploitations étudiées

Nous nous intéressons maintenant à la fréquence d'apparition des agents pathogènes respiratoires retrouvés dans chaque exploitation au moment des prélèvements. Nous pouvons voir que *P. multocida* est, de loin, la bactérie la plus identifiée dans les trois exploitations, à chaque analyse (Figure 9). Sa fréquence de détection peut aller de 34,5% à 96,9%.

La seconde bactérie *H. somni* a été également identifiée lors de tous nos prélèvements avec des fréquence plus faibles (entre 12,1% et 30%).

La détection des quatre autres agents pathogènes, à savoir *M. bovis*, BCoV, BRSV et BPI3, dépend à la fois de l'exploitation et du moment des prélèvements.

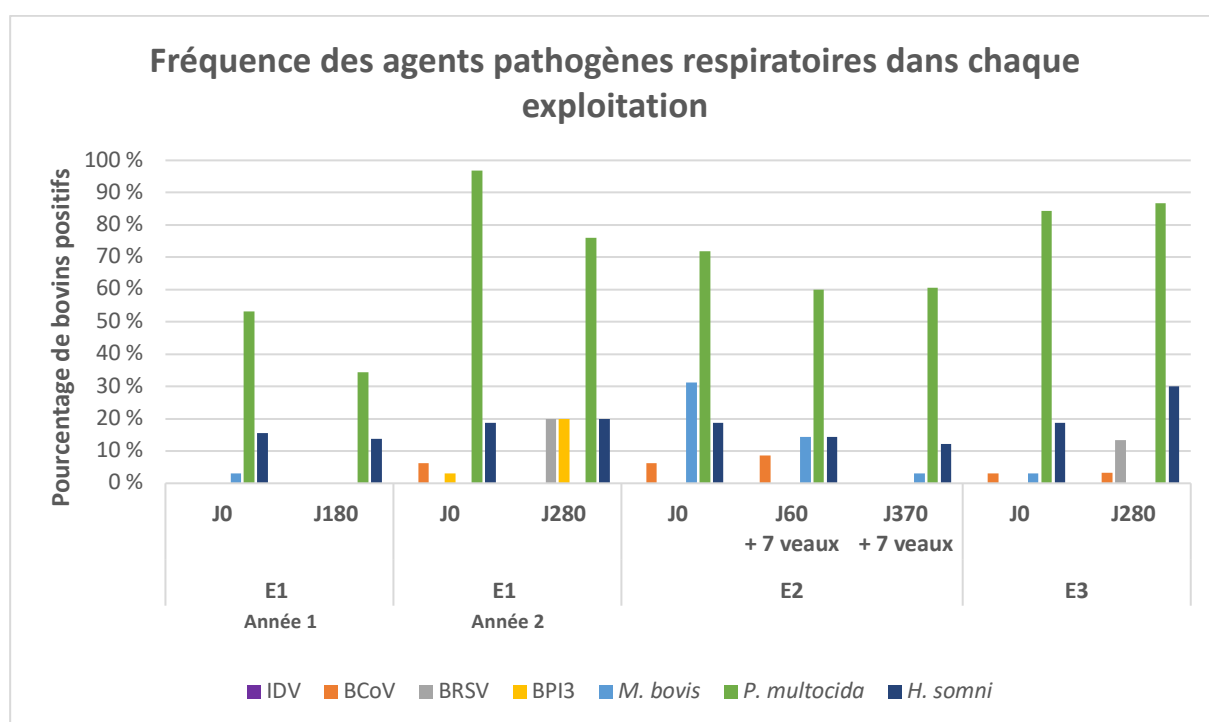


Figure 10 : Fréquence des agents pathogènes respiratoires dans chaque exploitation, à la date des prélèvements

ii. Fréquence de détection des agents pathogènes respiratoires dans l'exploitation E1

L'exploitation E1 a été étudiée durant deux années consécutives.

Nous pouvons voir, durant la première année, des résultats positifs pour *P. multocida* avec une fréquence d'apparition de 53% en début d'année et 34% pour la fin de l'année. Il y a également la présence de la bactérie *H. somni* pour 16% des bovins prélevés en début d'année et 14% en fin d'année. *M. bovis* a été retrouvée seulement en début d'année pour seulement 3% des bovins de l'exploitation.

Durant l'année 2, plus d'agents pathogènes ont été retrouvés dans les EN. *P. multocida* a toujours une fréquence de détection largement supérieure avec 97% en début d'année et 76% en fin d'année. La fréquence d'identification de *H. somni* est plus ou moins similaire à l'année 1 avec 19% en début d'année et 20% en fin d'année. Durant l'année 2, *M. bovis* n'a pas été identifié, mais BPI3 a été retrouvé pour 3% des bovins en début d'année et 20% en fin d'année. Pour finir, BCoV a été identifié seulement en début d'année (pour 6% des bovins) et BRSV seulement en fin d'année (20%). (Figure 10)

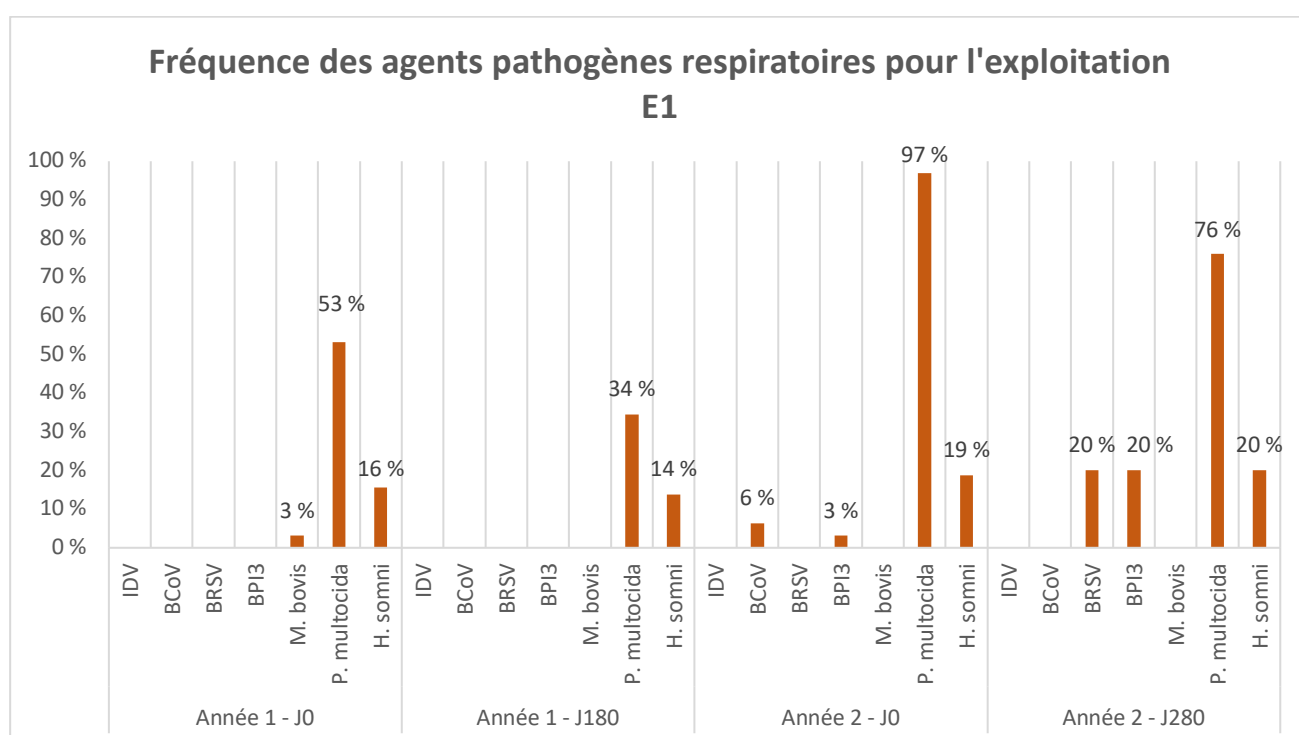


Figure 11 : Fréquence des agents pathogènes respiratoires pour l'exploitation E1

La figure 11, présente les mêmes résultats que la figure 10, mais en précisant le Ct obtenu par q-PCR pour chaque échantillon. Ces données nous donnent une idée relative des charges infectieuses présentes.

Pour l'année 1, nous pouvons remarquer que les valeurs des Ct sont relativement homogènes avec des valeurs élevées. En effet, pour *M. bovis* et *H. somni*, et la majorité des échantillons positifs à *P. multocida*, les Ct sont compris entre 30 et 40. Seulement deux échantillons ont présenté des Ct entre 25 et 30 pour *P. multocida* en

début et en fin d'année ; et un échantillon a obtenu le Ct de 24,91 à J0 pour *P. multocida*.

Pour l'année 2, nous avons obtenu des résultats plus variés avec des Ct pouvant aller de 17 à 37,47 pour les échantillons.

Les bactéries *P. multocida* et *H. somni* présentent des charges bactériennes assez hétérogènes avec des valeurs de Ct comprises entre 19 et 36.

Trois virus ont été également retrouvés lors de la deuxième année, avec des charges bactériennes relativement importantes. Nous trouvons BCoV seulement à J0 avec deux échantillons obtenant un Ct de 28,07 et 28,24. BPI3 a été identifié une fois à J0 avec un Ct de 23,59 et cinq fois à J280 avec des Ct entre 20 et 27,15.

Pour finir, BRSV a été également détecté, sur cinq échantillons, avec des valeurs comprises entre 17 et 22,34 (soit des charges bactériennes considérées comme importantes pour ce virus).

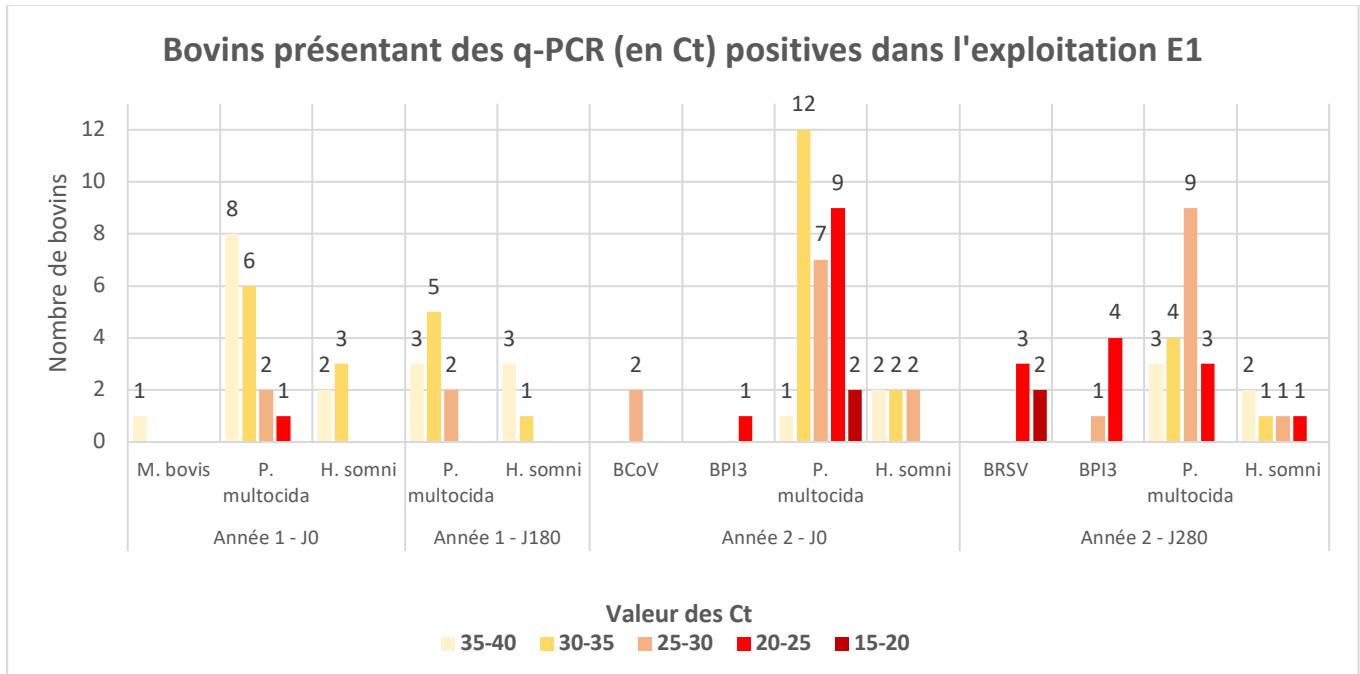


Figure 12 : Bovins présentant des q-PCR (en Ct) positives dans l'exploitation E1

iii. Fréquence de détection des agents pathogènes respiratoires dans l'exploitation E2

L'exploitation E2 a été étudiée durant une année. Trois dates de prélèvements ont été réalisées, à J0, J60 et J370.

Nous avons obtenu des résultats positifs à *P. multocida* pour chaque date de prélèvements avec une fréquence de détection de 71,9% à J0, 60% à J60 et 66,7% à J370.

Il y a également la présence de *H. somni* dans nos échantillons, pour 18,8% des bovins prélevés en début d'année, 14,3% à J60 et 12,1% en fin d'année. *M. bovis* a été retrouvé lors des trois dates à une fréquence de 31,3% à J0, 14,3% à J60 et 3% en fin d'année.

Le virus BCoV a également été identifié lors des premiers et seconds prélèvements chez 6,3% et 8,6% des bovins. (Figure 12)

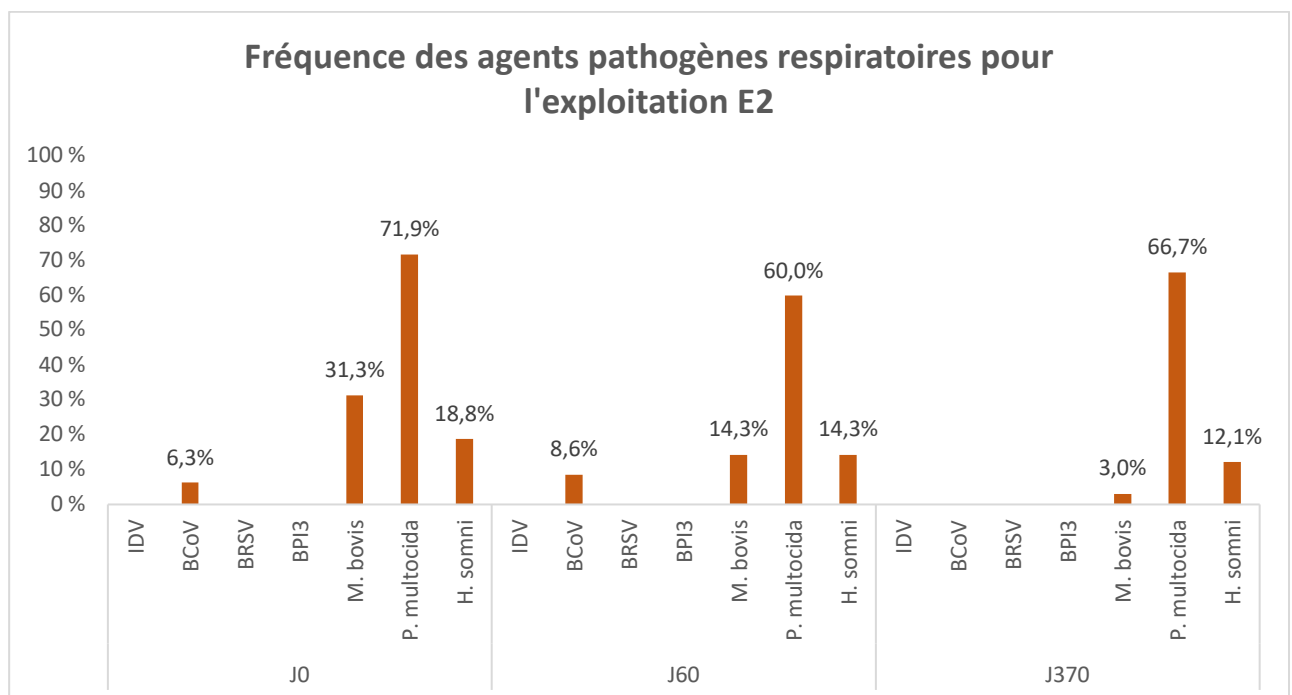


Figure 13 : Fréquence des agents pathogènes respiratoires pour l'exploitation E2

La figure 13, nous indique les Ct obtenus à la q-PCR pour l'exploitation E2.

Nous pouvons remarquer que les valeurs des Ct de ces échantillons sont assez élevées. En effet, seulement quatre échantillons sont entre 22 et 25, le reste est compris entre 25 et 36.

Pour *P. multocida*, respectivement neuf, deux et trois échantillons ont des Ct compris entre 35 et 40 pour J0, J60 et J370. Neuf, dix et neuf échantillons entre 30 et 35. Quatre, huit et sept échantillons entre 25 et 30 et un seul échantillon par date de prélèvement a eu un Ct entre 21 et 24.

La bactérie *H. somni* a obtenu des résultats de Ct entre 28 et 34 pour les trois dates de prélèvements ; et *M. bovis* entre 26 et 33.

Pour finir, BCoV a été retrouvée à J0 deux fois avec des Ct de 22,35 et 29,89. A J60, il a été identifié trois fois avec des valeurs entre 30 et 32.

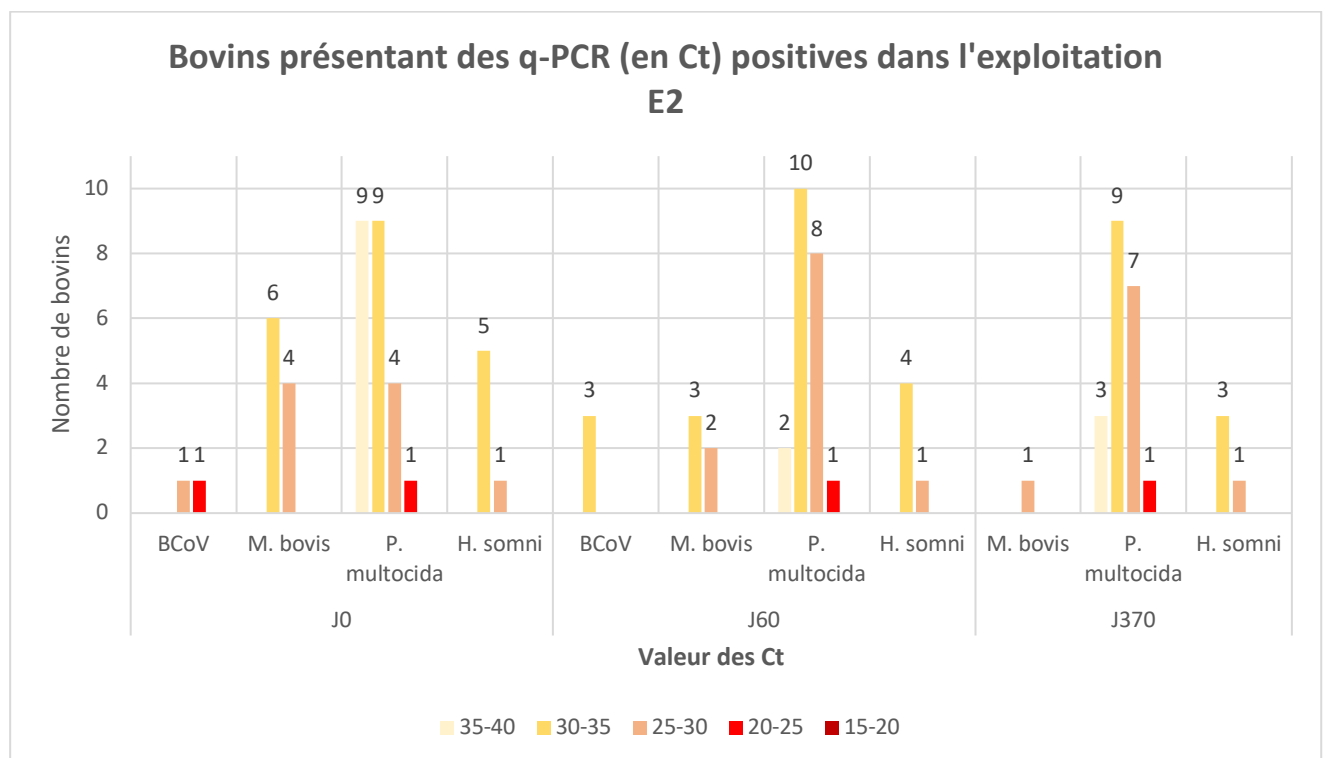


Figure 14 : Bovins présentant des q-PCR (en Ct) positives dans l'exploitation E2

iv. Fréquence de détection des agents pathogènes respiratoires dans l'exploitation E3

L'exploitation E3 a été testée pendant l'année 2 durant presque un an. Deux séries de prélèvements ont été réalisées, à J0 et à J280.

Nous pouvons remarquer que la fréquence d'apparition de *P. multocida* est élevée avec des valeurs de 84,4% pour J0 et 86,7% pour J280. 18,8% des bovins prélevés étaient positifs à *H. somni* à J0 et 30% à la fin de l'année.

Pour finir, BCoV a été identifié avec une fréquence de 3,1% à J0 et 3,3% à J280 ; et le virus BRSV a été seulement observé à la fin de l'année pour 13,3% des bovins prélevés.

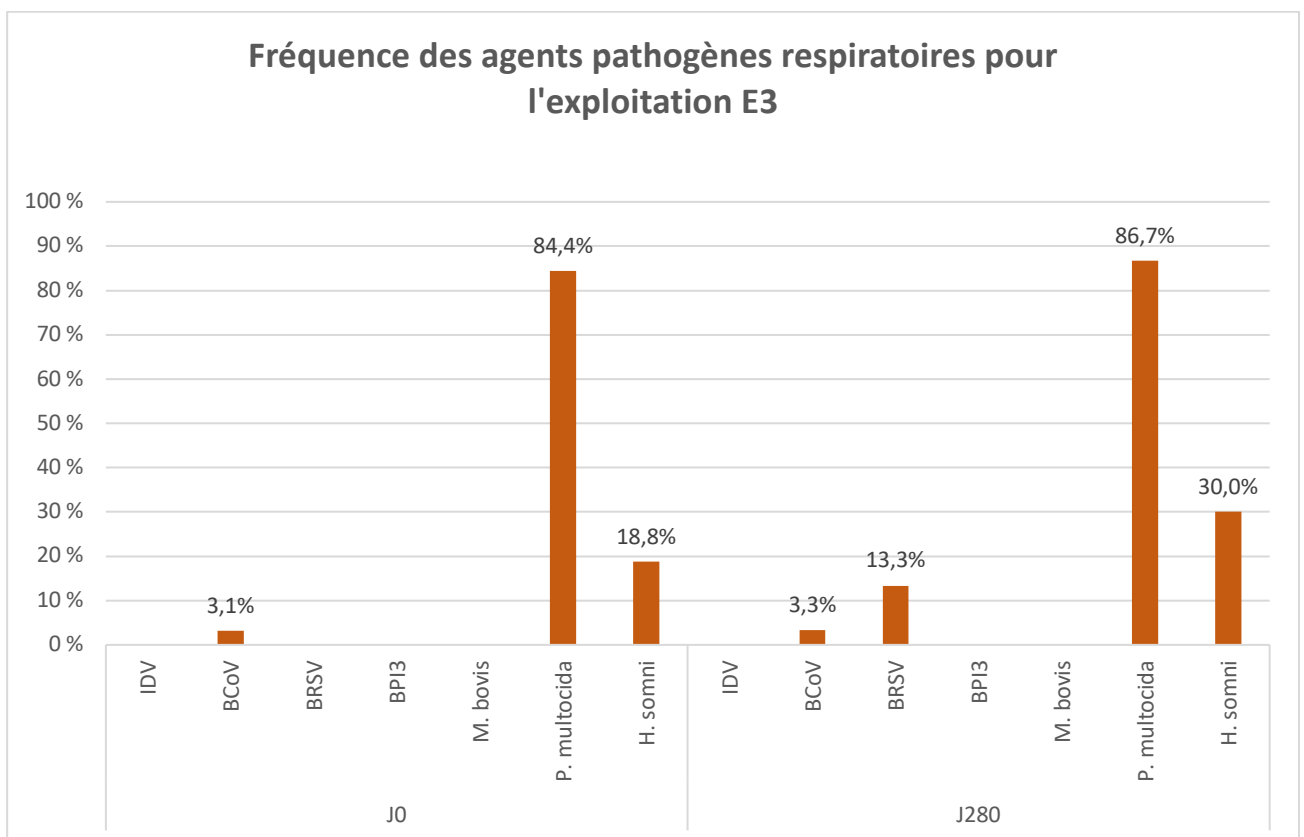


Figure 15 : Fréquence des agents pathogènes respiratoires pour l'exploitation E3

La figure 15, nous indique les Ct obtenus à la q-PCR pour l'exploitation E3.

À J0, nous avons pu identifier dix échantillons positifs à *P. multocida* avec des Ct compris entre 30 et 35, six échantillons positifs entre 25 et 30 et onze entre 20 et 25. Pour la fin de l'année, huit échantillons étaient positifs avec des valeurs entre 35 et 40, huit également entre 30 et 35, six entre 25 et 30, deux entre 20 et 25 et deux entre 15 et 20.

Pour la bactérie *H. somni*, les résultats au début de l'année sont assez homogènes avec un à deux échantillons positifs pour chaque intervalle de Ct. Pour la fin de l'année, cependant, cinq échantillons se sont révélés positifs avec des Ct compris entre 30 et 35. Un échantillon a obtenu un Ct de 39,66 ; un à 27,08 ; et deux à 21,99 et à 20,54.

BCoV a été détecté une fois en début d'année avec un Ct faible (22,98) et une fois en fin d'année avec un Ct plus élevé (35,68). *M. bovis* a été seulement identifié en début d'année avec un Ct de 36,4.

BRSV a été détecté seulement en fin d'année sur quatre échantillons dont trois ayant un Ct compris entre 20 et 25 et un échantillon à 28. Tout comme l'exploitation E1, les charges sont considérées comme importantes pour ce virus.

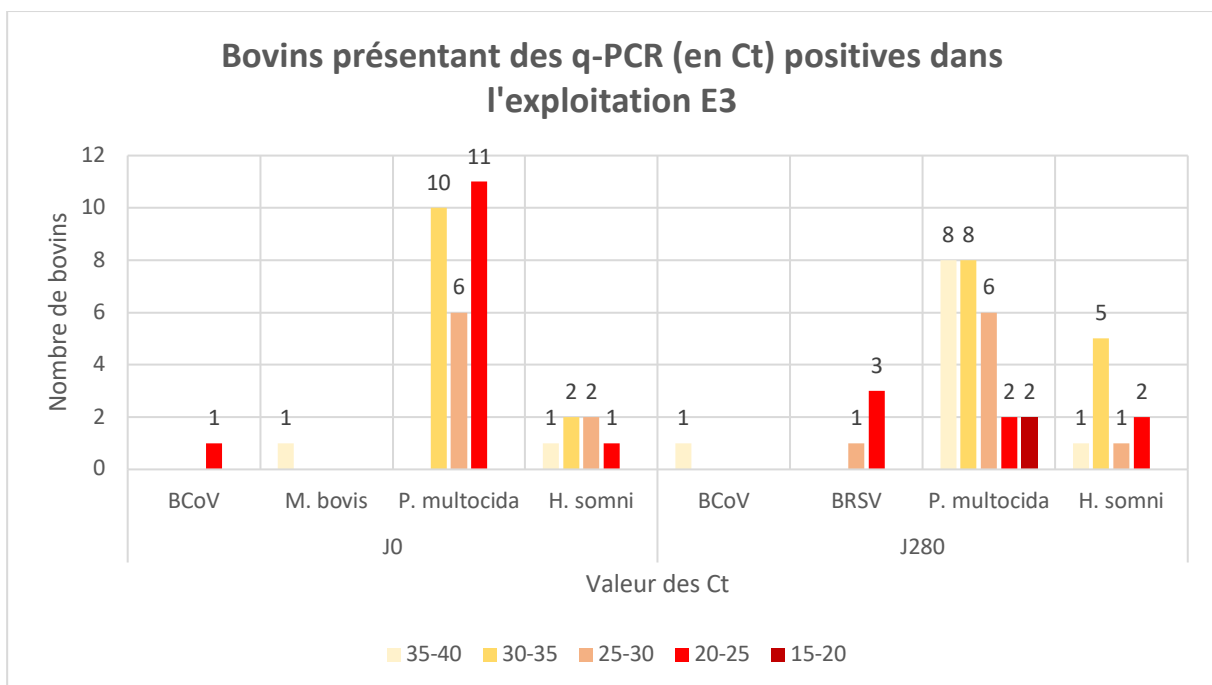


Figure 16 : Bovins présentant des q-PCR (en Ct) positives dans l'exploitation E3

b. Fréquence de détection des agents pathogènes selon le stade physiologique

En regroupant les résultats obtenus en deux ans pour les trois exploitations, il est possible d'identifier la fréquence d'apparition des agents pathogènes respiratoires en fonction du stade physiologique des bovins prélevés.

D'après la figure 16, nous pouvons remarquer que chez les veaux, les agents pathogènes sont les plus variés. Il y a à la fois des bactéries *P. multocida*, *H. somni* et *M. bovis* et des virus BCoV, BRSV et BPI3. Pour les génisses, les mêmes agents infectieux sont retrouvés avec des fréquences similaires excepté pour *M. bovis* et BCoV qui n'ont pas été identifiés dans les prélèvements.

Concernant les adultes, *P. multocida*, *H. somni*, *M. bovis*, BRSV et BPI3 ont été retrouvés à des fréquences équivalentes. Toutefois, les adultes n'ont pas présenté de résultats positifs lors de la recherche de BCoV.

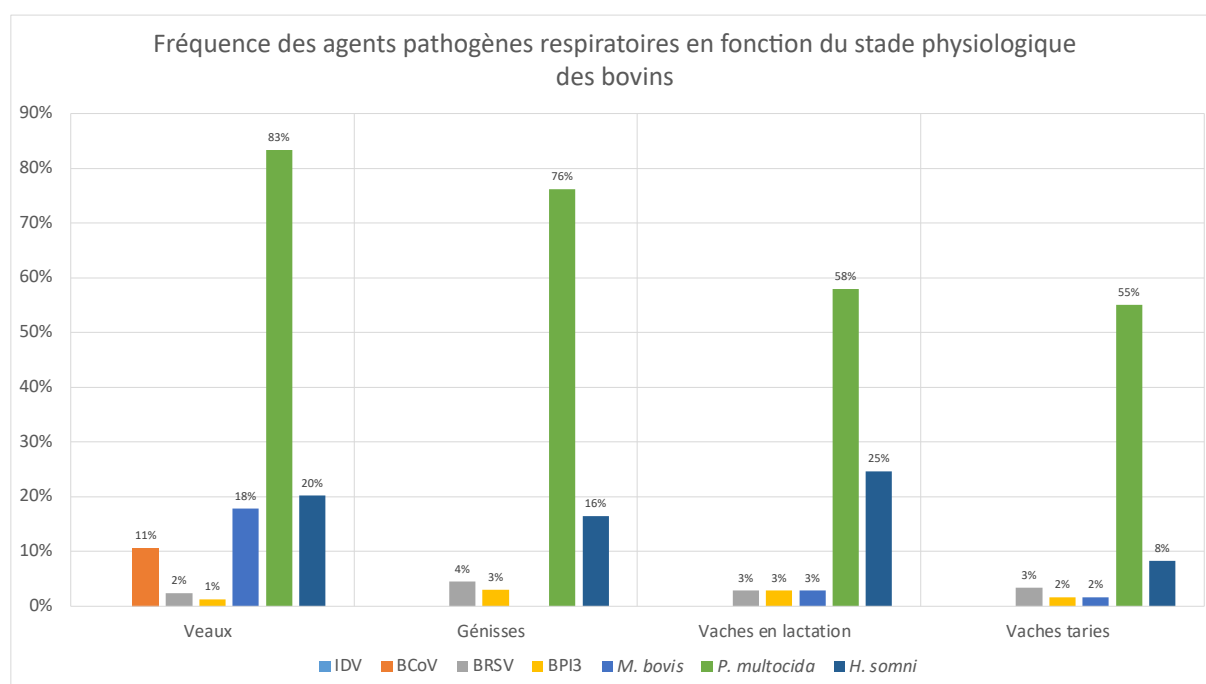


Figure 17 : Fréquence des agents pathogènes respiratoires en fonction du stade physiologique des bovins

c. Co-infections à l'échelle de l'expérience

Au sein des trois élevages, nous pouvons remarquer que les associations d'agents pathogènes ne sont pas majoritaires dans les infections (Figure 17). L'annexe 2 présente les résultats détaillés en tableaux Excel des q-PCR (avec les valeurs) pour chaque bovin prélevé. Ainsi, il est possible de voir la présence de mono ou de co-infection pour chaque bovin.

Au total, 150 bovins prélevés sur les 213 bovins positifs avec au moins un agent pathogène (70,4%) présentent une mono-infection durant cette expérience. En effet, pour les exploitations E1 année 1, E1 année 2, E2 et E3, respectivement 80,7%, 68,5%, 69,4% et 63,6% des échantillons positifs sont des mono-infections.

Toutefois, quelques co-infections ont pu être identifiées. Certaines associations semblent même, se retrouver au cours des années et dans les différents élevages.

L'association *P. multocida* avec *H. somni* est la co-infection la plus répandue dans nos trois exploitations. En effet, pour E1 durant la première année, 5 bovins sur 61 (8,2% des bovins) présentent les deux pathogènes dans leur prélèvement ; 12,3% pour la seconde année de E1 ; 6% pour E2 et 19,4% de bovins ont présenté cette association au moment des prélèvements pour E3.

La co-infection entre *P. multocida* avec *M. bovis* a été également présente pour 9% des bovins dans l'exploitation E2 et 1,6% des bovins de l'exploitation E3.

Concernant les autres associations retrouvées (*P. multocida* / BCoV, *P. multocida* / BRSV, *H.somni* / *M.bovis*...) , seulement 1 à 3 bovins par exploitation ont obtenu un résultat positif à ces association d'agents pathogènes.

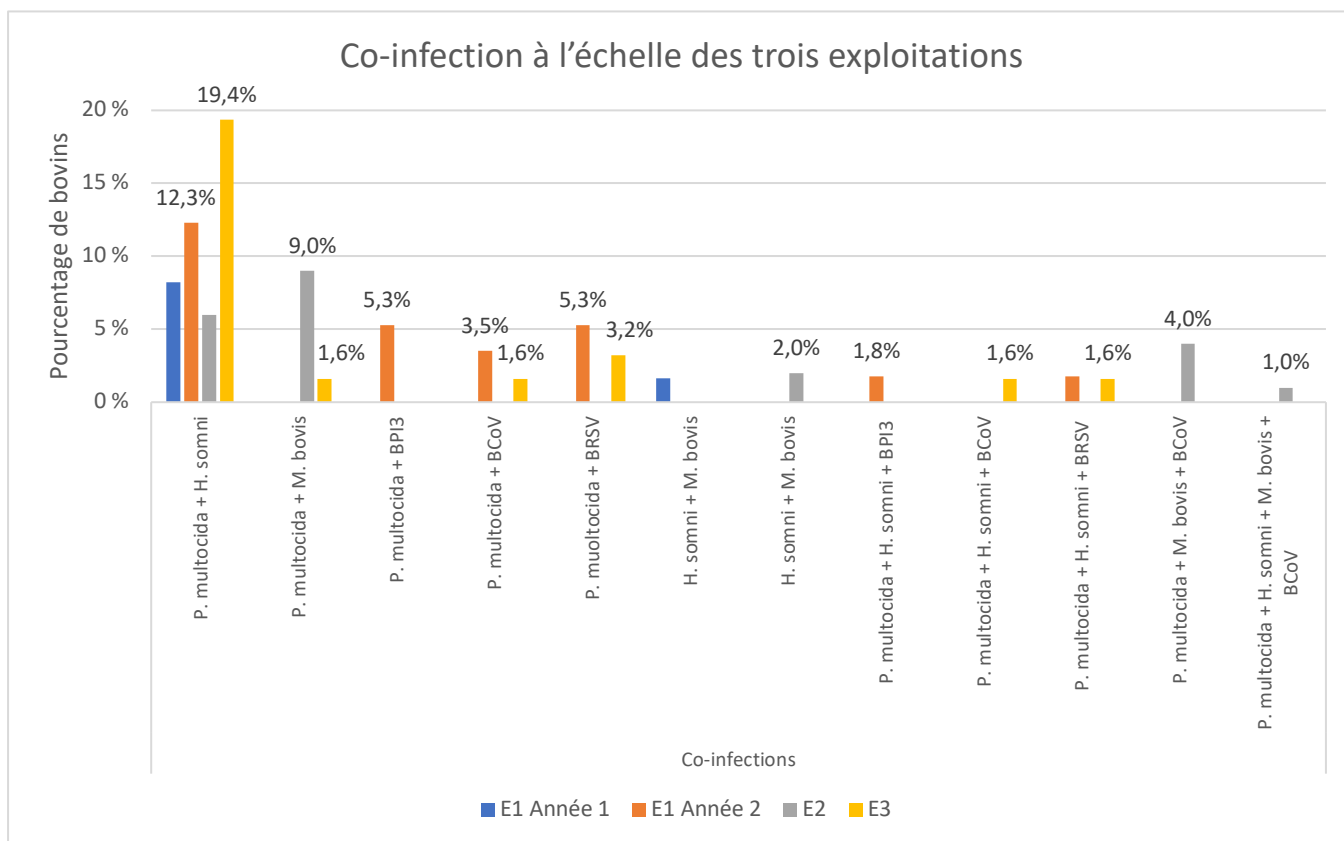


Figure 18 : Pourcentage de co-infections à l'échelle des trois exploitations

d. Co-infection à l'échelle des exploitations en fonction du stade physiologique des bovins

Le tableau 5 présente le pourcentage de co-infections par exploitation en fonction du stade physiologique des bovins prélevés. Les résultats détaillés des co-infections sont présentés dans l'annexe 2.

Nous pouvons remarquer que la présence de co-infections dans nos prélèvements est plus élevée chez les veaux. En effet, la fréquence de co-infections a atteint 50% des veaux prélevés dans l'exploitation E1 à J0, et 100% des veaux à J0 pour E2. De même, chez les veaux malades à J60 pour E2, 71% présentaient une co-infection avec au moins deux agents pathogènes respiratoires.

Concernant les autres stades physiologiques des bovins (génisses, vaches tarées et vaches en lactation), les pourcentages de co-infections sont assez faibles. En effet, on

retrouve en moyenne un à trois bovins coinfectés sur huit bovins prélevés (soit 12,5% à 37,5%) dans chaque lot de stade physiologique.

Pour les génisses de l'exploitation E1 à J270, 100% ont présenté une co-infection. Toutefois, sur les huit génisses prélevées à J0, trois étaient encore présentes dans la stabulation (et donc ont pu être prélevées à J270). Les cinq autres n'ont pas pu être prélevées car elles étaient au pâturage. Sur les trois génisses prélevées, toutes ont présenté une co-infection avec deux agents pathogènes respiratoires.

Tableau 5 : Pourcentage de co-infections par exploitation en fonction du stade physiologique des bovins

	E1				E2			E3	
	J0	J180	J0	J270	J0	J60	J370	J0	J280
Année	1	1	2	2	1	1	1	1	1
Veaux	25 %	0	50 %	37,5%	100 %	0	25%	25 %	37,5 %
Génisses	12,5 %	0	0	100 %	0	12,5 %	12,5 %	25 %	25 %
Vaches Tarées	0	0	12,5 %	43 %	0	0	0	12,5 %	33 %
Vaches en Lactation	12,5 %	0	37,5 %	0	50 %	0	0	37,5 %	37,5%
Nouveaux veaux Ajoutés dans l'année en cours						71 %	20%		

2. Signes cliniques

a. Importance des signes cliniques lors de mono ou de poly infection chez les bovins

La figure 18 indique le score clinique moyen de toutes les exploitations confondues en fonction du nombre de pathogènes identifiés dans les EN.

Nous constatons que 119 bovins non scorés (c'est-à-dire qu'ils ne présentaient pas de symptômes respiratoires particuliers nécessitant de faire un score clinique) sur 213 bovins testés positifs (soit 56%) présentent une mono-infection. 30 bovins testés positifs avec un score égal à 0 (14%) ont révélé une co-infection avec deux agents pathogènes et 2 bovins scoré 0 (1%) ont une co-infection avec trois agents pathogènes.

Lorsque le score clinique est évalué à 4, nous observons que 12 bovins sur 213 bovins testés positifs (soit 6%) présentent une mono-infection et 7 bovins (3%) une co-infection avec deux agents pathogènes.

Pour un score clinique de 5, 9 bovins (4%) possèdent une mono-infection, 7 bovins (3%) une co-infection avec deux agents pathogènes et un seul bovin (0,5%) une co-infection à trois agents pathogènes

Pour un score clinique de 6, 5 bovins (2%) portent une mono-infection, 5 bovins (2%) une co-infection avec deux agents pathogènes et un bovin (0,5%) une co-infection à trois agents pathogènes.

Seul un bovin a développé une mono-infection lorsque le score clinique est de 7. Respectivement, 4 bovins (2%), 2 bovins (1%), et 1 bovin (0,5%) ont présenté un score clinique de 7 alors qu'ils étaient coinfecteds avec 2, 3 et 4 agents pathogènes.

Pour un score clinique de 8, 2 veaux (1%) ont été testés positifs à une mono-infection à *P. multocida* et 2 veaux (1%) à une co-infection soit entre *P. multocida* et *H. somni* soit entre *P. multocida* et *M. bovis*.

Un score clinique de 9 a été établi sur un veau présentant une mono-infection à *P. multocida*. Deux scores cliniques de 10 ont été retrouvés sur deux veaux : un ayant une mono-infection à *P. multocida* et un autre porteur d'une co-infection entre à *P. multocida* et BCoV.

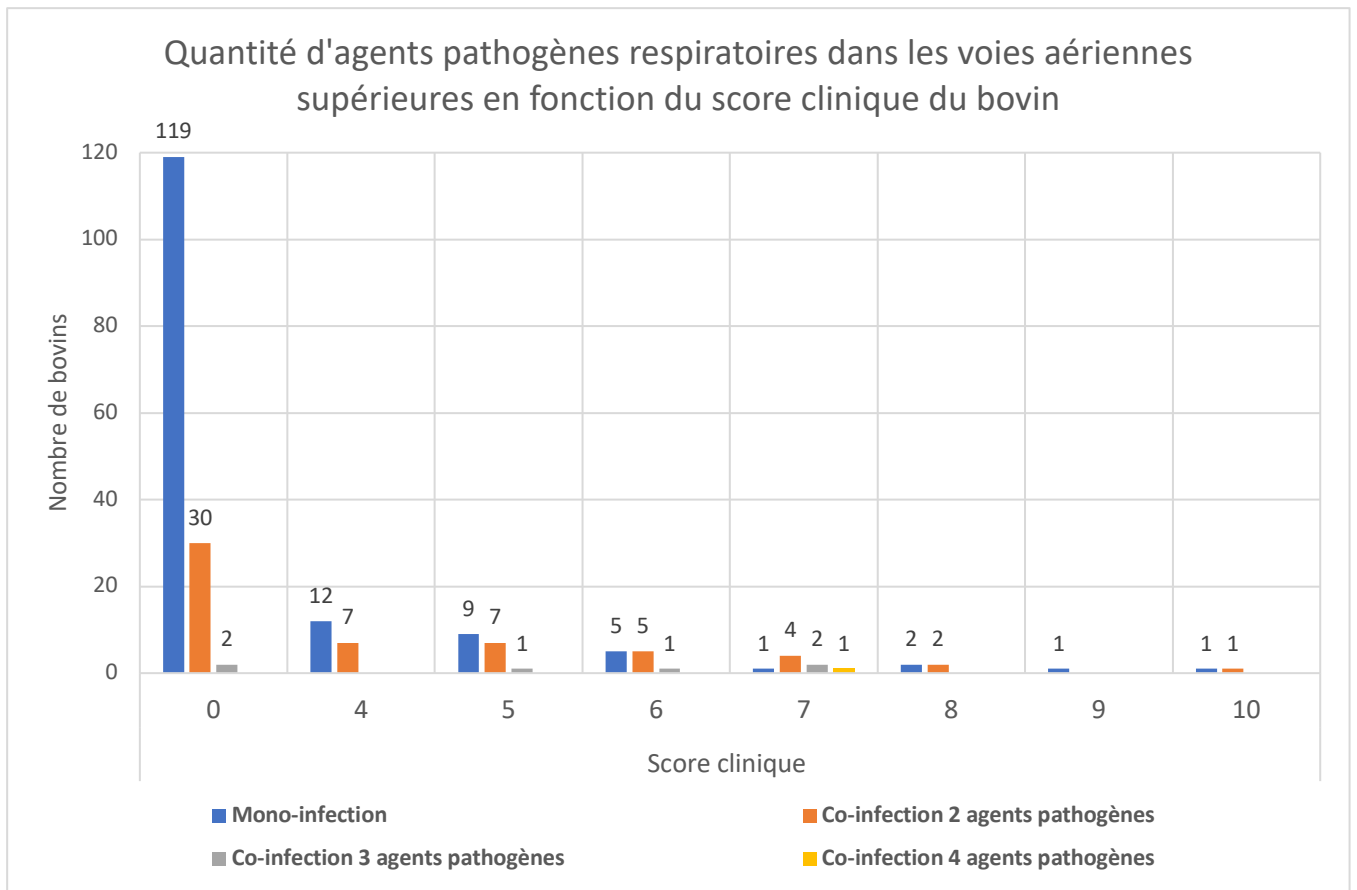


Figure 19 : Quantité d'agents pathogènes respiratoires dans les voies aériennes supérieures en fonction du score clinique du bovin

Pour les bovins ayant été évalués par un score clinique (score allant de 4 à 10), nous avons détaillé les symptômes respiratoires afin de déterminer quels sont les signes cliniques les plus fréquents en fonction du score clinique obtenu (Figure 19).

La décision d'effectuer ou non le score clinique sur les bovins repose sur la présence de toux au moment de notre visite. Ainsi, 100% des bovins scorés présentaient de la toux.

Nous pouvons remarquer que plus le score obtenu est important, plus il y a la présence d'hyperthermie. De même, plus le score clinique augmente, plus les bovins présentes des écoulements nasaux et des bruits respiratoires. La tachypnée est systématiquement retrouvée chez les bovins scorés.

Aucun bovin n'a présenté un refus alimentaire ou une modification de comportement lors de nos prélèvements.

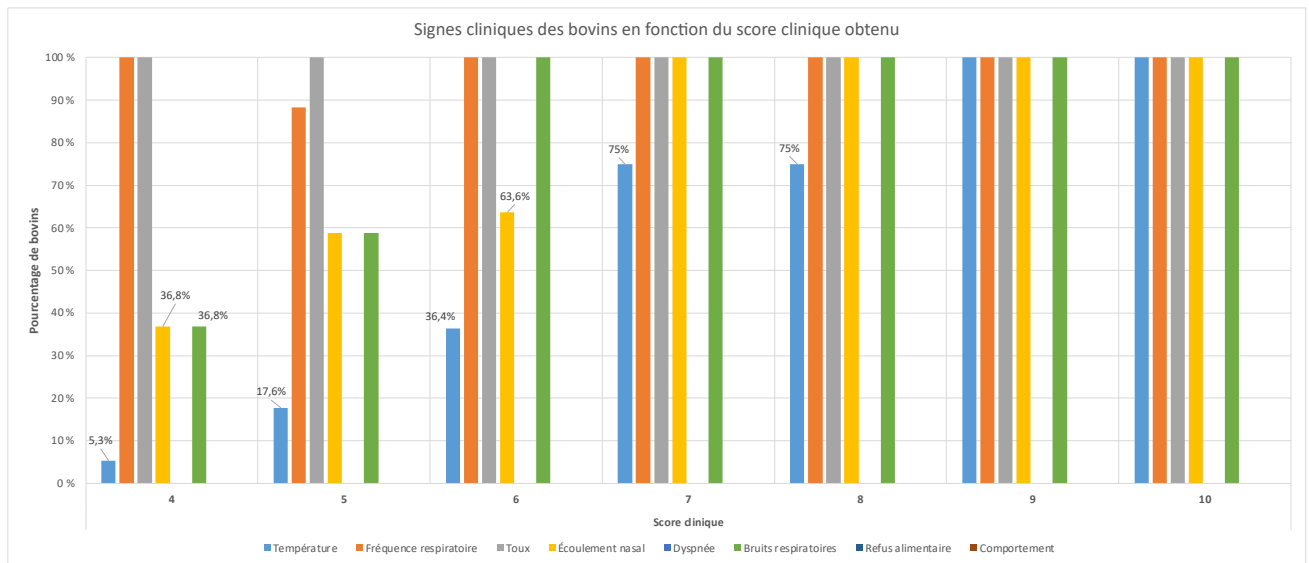


Figure 20 : Signes cliniques des bovins en fonction du score clinique obtenu

b. Relations entre le score clinique et les agents pathogènes présents dans les voies respiratoires supérieures

La figure 20 indique quels sont les agents pathogènes spécifiquement retrouvés dans les EN en fonction du score clinique qui a été donné aux bovins.

Nous pouvons voir que pour tous les scores cliniques obtenus, le pathogène majoritairement retrouvé est *P. multocida* en mono-infection.

La co-infection *P. multocida* et *H. somni* est souvent observée lorsque le score clinique est égal à 7 ou 8. De même, l'association *P. multocida* et *M. bovis* est fréquemment retrouvée lorsque le score clinique est de 6 ou de 8. D'autres co-infections ont été identifiées sur quelques bovins comme *P. multocida* / BPI3, *P. multocida* / BCoV, *P. multocida* / BRSV, *P. multocida* / *H. somni* / BCoV...

Toutefois, il est intéressant de remarquer que les agents pathogènes retrouvés sur les bovins présentant des scores cliniques élevés (score à 9 ou à 10), sont les mêmes que ceux retrouvés avec des scores cliniques plus faibles. En effet, le veau présentant le score clinique de 9 est a révélé un résultat positif pour seulement *P. multocida*. Pour

les deux bovins scorés à 10, *P. multocida* et l'association *P. multocida* et BCoV ont été identifiées.

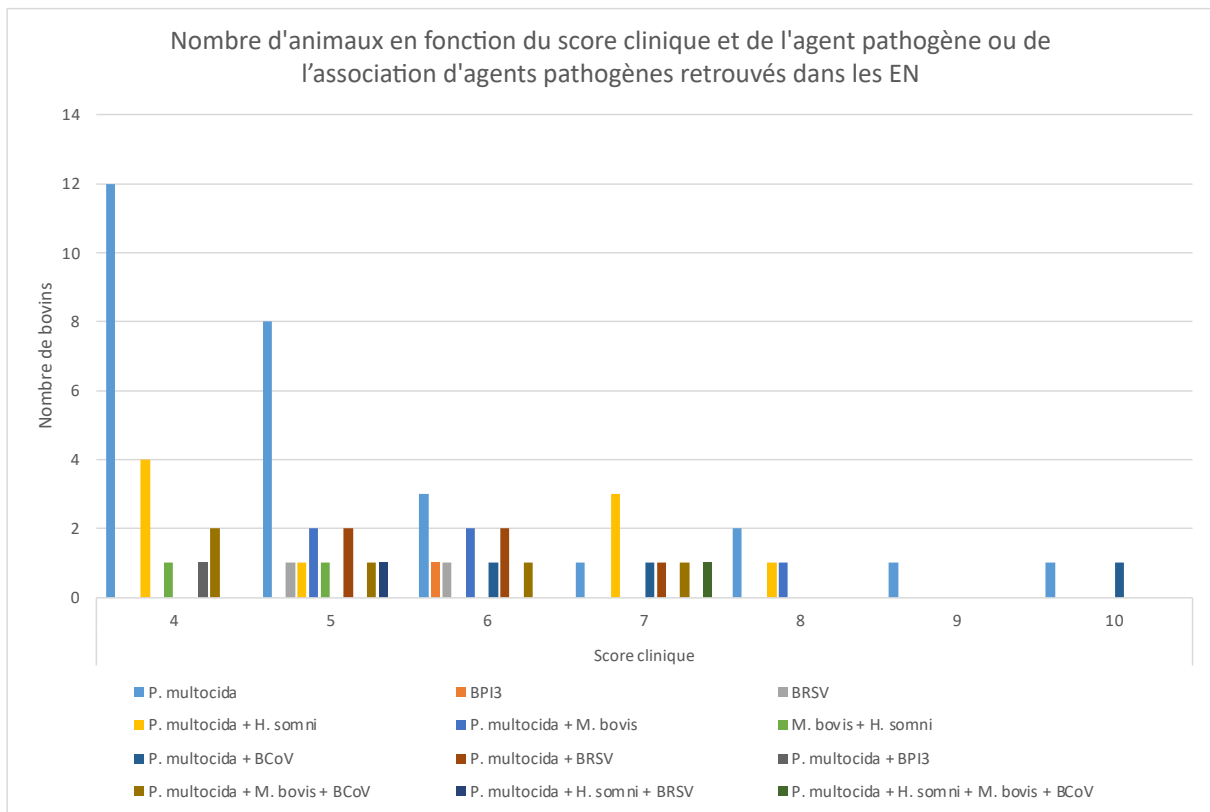


Figure 21 : Nombre d'animaux en fonction du score clinique des bovins et de l'agent pathogène ou de l'association d'agents pathogènes retrouvés dans les EN

3. Fréquence d'identification et rôle pathogène du virus IDV

a. Fréquence de détection d'IDV chez individus sains et malades

Aucun prélèvement réalisé durant les deux années, dans les trois exploitations, n'a permis de détecter le virus IDV par q-PCR.

b. Sérologie IDV sur les trois exploitations

i. Vue globale des trois exploitations laitières

Nous avons pratiqué les sérologies IDV sur tous les sérums recueillis lors de nos prélèvements. Au total, 110 bovins ont montré une séropositivité à l'IDV sur les 280 bovins prélevés soit un pourcentage de 39,29% (Annexe 3).

Le tableau 6 résume les résultats obtenus pour chaque exploitation en début et en fin d'année.

Un résultat $< 1 :10$ est considéré comme négatif et un résultat entre $1 :10$ et $1 :160$ est considéré comme positif. Plus la dilution est importante, plus il y a d'anticorps dans le sérum.

Nous constatons que pour E1 durant l'année 1, seulement 4 sérums étaient positifs à J0. Les valeurs de dilution étaient assez faibles ($1 :10$). Il n'y avait pas de résultat positif à l'IHA pour la fin de l'année.

Pour la seconde année, il y a eu plus de résultats positifs. En début d'année, 8 sérums prélevés se sont révélés négatifs, contre 24 positifs. Dans les 24 positifs, la majorité des sérums ont eu un titre entre 10 et 40 et 2 ont eu un titre à 160.

Pour la fin de l'année, il y a eu moins de résultats positifs avec seulement 10 sérums présentant des anticorps.

Pour l'exploitation E2, en début d'expérience (J0) 8 échantillons étaient positifs contre 24 négatifs. À J60, seulement 5 échantillons étaient positifs avec des titres de 10.

Pour la fin de l'année, 13 sérums sont revenus positifs dont la majorité avec un titre de 20.

Pour finir, l'exploitation E3 a présenté beaucoup plus de résultats positifs avec 26 échantillons séropositifs (pour 32 prélèvements au total) en début d'année. La majorité des sérums ont obtenu une dilution de $1 :40$.

Pour la fin de l'année, il y a eu beaucoup de séroconversion puisque 20 sérums sur 30 étaient positifs. Ici encore, la majorité des sérums ont obtenu un titre à 40.

Tableau 6 : Résultats des tests d'inhibition de l'hémagglutination pour les souches D/5920 pour tous les prélèvements

	E1 Année 1		E1 Année 2		E2			E3	
	J0	J180	J0	J280	J0	J60 + 7 veaux	J370	J0	J280
<10	28	32	8	15	24	30	19	6	10
10	4	0	2	1	5	5	4	2	4
20	0	0	3	7	3	0	5	6	4
40	0	0	7	2	0	0	2	14	9
80	0	0	10	0	0	0	2	4	3
160	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Total BV séropositifs	4	0	24	10	8	5	13	26	20
Total BV prélevés	32	29	32	25	32	35	33	32	30

ii. Séropositivités des bovins prélevés

Les séropositivités obtenues pour la souche D/5920 sont récapitulées dans le tableau 7.

Le tableau ci-dessous résume les séropositivités apparentes et réelles par rapport à l'exploitation et au moment des prélèvements.

Tableau 7 : Séroprévalences apparentes et réelles (en pourcentages) et intervalles de confiance associés des résultats des tests d'IHA pour la souche D/5920 (IC = Intervalle de Confiance) en fonction des exploitations et des dates de prélèvements

	E1 Année 1		E1 Année 2		E2			E3	
	J0	J180	J0	J280	J0	J60 + 7 veaux	J370	J0	J280
Fréquence IDV apparente	13%	0%	75%	40%	25%	14%	39%	81%	67%
Fréquence IDV réelle réalisée avec Epitools (Blaker)	12,92%	0%	83,15%	43,82%	26,97%	14,93%	44,52%	90,17%	74,00%
Borne inférieure IC à 95%	4,46%	0%	63,93%	25,17%	13,77%	5,91%	27,55%	71,56%	53,69%
Borne supérieure IC à 95%	30,41%	0%	96,35%	65,46%	46,16%	31,88%	63,75%	100%	89,60%

Pour l'exploitation E1 durant l'année 1, la séroprévalence apparente est de 13% à J0.

Pour l'année 2, à J0, on a 75% de séroprévalence apparente et 40% à J280.

Pour l'exploitation E2, on a 25% en début d'année, 14% à J60 et 39% en fin d'année.

Pour finir, pour l'exploitation E3, on a 81% en début d'année et 67% en fin d'année.

En se basant sur l'étude de Saegerman *et al.* réalisée en 2021, la sensibilité et la spécificité des tests IHA ont été déterminées pour la souche D/5920. Celles-ci sont respectivement de 68,04% et de 96,12%. (134)

Les séroprévalences réelles peuvent ainsi être calculées par le site Epitools (©Ausvet 2022) (Tableau 7).

La figure 21 récapitule les séropositivités en fonction du stade de physiologique des bovins prélevés.

Pour rappel, nos échantillons étaient de 8 bovins par lot à J0, puis le total de bovins a évolué en fonction des sorties ou du pâturage.

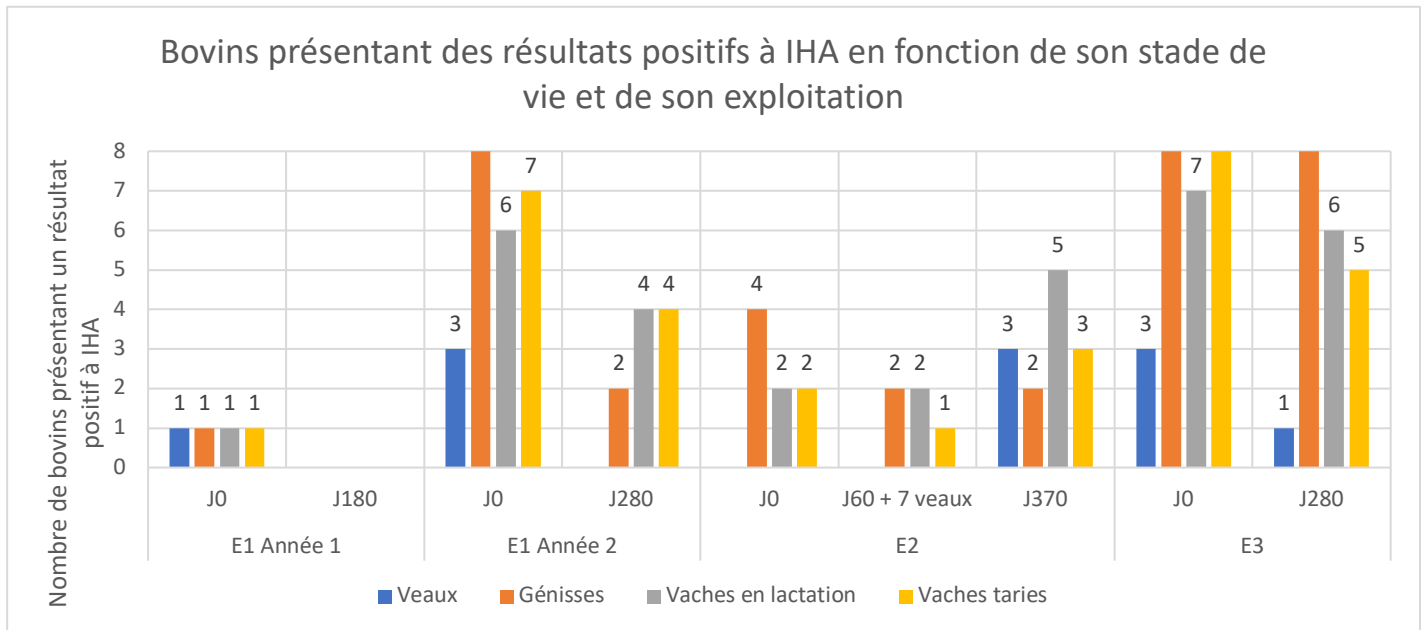


Figure 22 : Bovins présentant des résultats positifs à IHA en fonction de son stade de vie et de son exploitation

Nous pouvons remarquer que pour la majorité des exploitations, entre 0 et 3 veaux sur 8 présentent une séropositivité lors de chaque prélèvement.

Concernant les autres stades physiologiques (génisses, vaches en lactation et vaches tarées), le nombre de bovins séropositifs est plus importants, allant jusqu'à 100% de positivité dans un lot prélevé.

Seule l'exploitation E1 à la fin de l'année 1 n'a présenté aucune séropositivité lors de notre analyse IHA.

IV. Discussion

1. Prévalence et association d'agents pathogènes dans les BPI dans les exploitations laitières

a. Prévalence des agents pathogènes dans les exploitations laitières

La fréquence des différents agents pathogènes respiratoires identifiés au cours de cette étude est assez variable. Nos résultats sont en adéquation avec les données des recherches antérieurement publiées, qui indiquent de grande variation en fonction du lieu et/ou de l'année d'étude (103).

La bactérie la plus souvent identifiée est *P. multocida*, chez 69,3% des bovins de notre étude. Plusieurs études révèlent que cette bactérie est la pasteurelle la plus fréquemment isolée ces dernières années en France (103). Cela s'explique en partie par la nature des prélèvements (écouvillons nasaux) et la forte capacité de cette bactérie à persister dans les cavités nasopharyngées des bovins sains (59).

Lors de notre étude, 47,6% des prélèvements positifs à au moins un agent pathogène, étaient positifs seulement à *P. multocida*. Pour 97% de ces prélèvements positifs seulement à *P. multocida*, les animaux ne présentaient pas de signes cliniques. Il est fort probable qu'il s'agissait d'un portage sain de la bactérie dans les cavités nasales. Cette notion de portage sain complique l'interprétation quant au rôle pathogène de ces bactéries lors de leurs détections dans les EN en cas de BPI. Pour *P. multocida* les données actuelles, expérimentales et épidémiologiques, suggèrent un pouvoir pathogène respiratoire modéré et un rôle dans les BPI, plutôt en association avec d'autres agents pathogènes (15).

H. somni a également été retrouvé pour 17,9% des échantillons. C'est le deuxième agent pathogène le plus présent dans nos résultats. Tout comme *P. multocida*, *H. somni* est une bactérie commensale pouvant subsister dans le nasopharynx des bovins. Dans notre expérience, *H. somni* seule a été retrouvée pour 6% de nos échantillons positifs. De plus, 100% des bovins positifs à *H. somni* uniquement, présentaient un score clinique de 0, suggérant là aussi un portage sain de la bactérie. Expérimentalement, le pouvoir pathogène respiratoire de *H. somni* est avéré lorsque la bactérie est présente dans les voies respiratoires profondes (135). De nombreux

facteurs liés à l'hôte, aux conditions d'élevage, à la présence d'autres agents pathogènes peuvent faciliter la colonisation pulmonaire à partir du nasopharynx et entraîner l'apparition de troubles respiratoires. On peut supposer que ce n'était pas le cas lors de la réalisation des prélèvements.

La dernière bactérie décelée dans nos échantillons est *M. bovis*. C'est une bactérie dont la présence est fréquemment observée dans les élevages de veaux de boucherie et moins dans les élevages laitiers. Dans notre étude, nous avons pu observer une prévalence de 6,4%. De plus, 100% de nos échantillons positifs à *M. bovis*, sont coinfestés avec au moins un autre agent pathogène. Cette bactérie a un réel pouvoir pathogène respiratoire, qu'elle exprime principalement en co-infection avec d'autres agents pathogènes (15).

Pour finir, trois virus BCoV, BPI3 et BRSV ont pu être identifiés à certains points de notre étude.

Le virus BCoV a été détecté dans 3,2% de nos échantillons, ce qui est relativement faible par rapport à d'autres études. Étonnamment, alors que son pouvoir pathogène respiratoire est plutôt considéré comme modéré, les scores cliniques des bovins positifs à ce virus étaient largement plus élevés que pour les autres agents pathogènes. En effet, les scores cliniques vont de 6 à 10, soit les scores les plus élevés de notre expérience. Dans la mesure où tous les échantillons positifs à BCoV sont également positifs à, au moins, un autre agent pathogène, on peut imaginer que l'expression clinique respiratoire est le fruit d'une association entre plusieurs pathogènes, dont le BCoV.

Ces résultats confirment certaines études suggérant que BCoV est un virus connu pour son potentiel pathogène mais que sa capacité à provoquer des infections respiratoires seules, est limitée. Les données d'infections expérimentales et épidémiologiques montrent plutôt que BCoV agit en association avec d'autres agents pathogènes (136).

Le virus BRSV a été également détecté dans 3,2% de nos échantillons. Il est intéressant de remarquer que ces résultats positifs proviennent autant des veaux, des génisses ou des bovins adultes (2 veaux, 3 génisses et 4 bovins adultes). Dans la

littérature, il est décrit que ce virus est surtout pathogène chez les veaux et les jeunes bovins. Dans notre expérience, sur les 9 bovins positifs, tous possédant un résultat de q-PCR très faible, c'est-à-dire une charge virale importante. Que ce soit en association avec d'autres agents pathogènes ou seul, les scores cliniques des animaux infectés par le BRSV variaient entre 5 et 7 (c'est-à-dire la moyenne haute de nos scores cliniques). Ces résultats sont en adéquation avec le pouvoir pathogène fort du virus déjà démontré lors d'études antérieures (40).

Nous pouvons également remarquer que BRSV a été détecté seulement en fin de deuxième année pour les exploitations E1 et E3. Cette observation est en accord avec l'idée que la circulation de ce virus est saisonnier et année dépendante, et est probablement liée aux conditions climatiques (42).

Le BPI3 est un agent pathogène respiratoire dont le pouvoir pathogène direct n'est pas encore clairement établi. La plupart des infections expérimentales sont souvent subcliniques ou bénignes (44). Sur les 6 prélèvements positifs à BPI3, deux sont des mono-infections et les bovins ont présenté un score clinique de 0. Beaucoup de recherches démontrent, cependant, la prédisposition des animaux déjà contaminés avec le BPI3 à être surinfectés par d'autres virus ou bactéries responsables (44).

Pour finir, rappelons qu'il n'a pas été possible de travailler sur *M. haemolytica* dans cette étude. Toutefois, cette bactérie est, comme les autres pasteurelles, capables de résider de manière permanente dans les cavités nasales des bovins. Son pouvoir pathogène respiratoire est cependant lui bien démontré et important chez les bovins.

Par ailleurs, durant ces deux années d'études, il n'y a pas eu d'épidémie de « grippe » au sein des trois exploitations. Quelques bovins présentaient des signes respiratoires mais aucun n'a été abattu, n'a perdu l'appétit ou n'a présenté des toux fortes ou de dyspnée. Plusieurs hypothèses sont possibles : soit un portage sain nasopharyngé pour les pasteurelles ou des prélèvements effectués à un stade précoce de l'infection lors de la période d'incubation. Afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses, il aurait été intéressant d'effectuer un contrôle clinique à 7 jours post-prélèvement afin d'évaluer si les bovins présentaient toujours les mêmes signes cliniques que lors des prélèvements, ou si les signes cliniques avaient évolué. A ce titre, les éleveurs ne

nous ont pas indiqué de pathologie respiratoire les jours après nos prélèvements, ce qui semble infirmer cette hypothèse. Pour les virus respiratoires, il est connu qu'une grande portion des animaux infectés font des formes subcliniques voire asymptomatiques. Vu la faible proportion d'animaux positifs lors de chaque prélèvement, on peut supposer que la pression d'infection était faible dans l'élevage avec peu d'animaux infectés et encore moins d'animaux malades.

b. Les co-infections dans les exploitations laitières

Aujourd'hui, la BPI est reconnue comme une maladie polymicrobienne et de nombreuses études montrent une fréquence élevée de co-infections. Dans notre étude, seulement 22,5% des prélèvements positifs l'étaient pour au moins deux agents pathogènes. Ce résultat est inférieur aux cas de poly-infection répertoriés dans la littérature. Toutefois nous ne comparons pas les mêmes populations. Notre étude s'est centrée sur un suivi d'une infection possible à IDV, sur une trentaine d'animaux dans trois fermes. Dans les études de référence sur les fréquences d'infection, les animaux sont testés une seule fois, en grand nombre et dans beaucoup plus d'élevages.

Par exemple, au Canada, 50,73 % des écouvillons nasaux prélevés sur une période de quatre ans (n=883 bovins) présentant des signes respiratoires étaient positifs pour au moins deux agents pathogènes respiratoires (64). Une seconde étude, en 2018, au Brésil, identifie au moins deux agents pathogènes dans 41 % des écouvillons nasaux (n=23) (63). Il est aussi important de noter que dans ces études, les bovins étaient tous prélevés en période d'épidémie. Très peu, voire aucun bovin n'était asymptomatique.

Quelques associations d'agents pathogènes ont pu être remarquées sur les 63 bovins poly-infectés de notre étude. La co-infection la plus fréquente est *P. multocida* et *H. somni*. Dans la majorité des cas, ces deux bactéries étaient présentes sur le même bovin à des charges bactériennes similaires, modérées à faibles (Ct allant de 27 à 36). Il est important de rappeler que ces deux bactéries sont présentes naturellement dans les voies respiratoires des bovins de manière commensale. Leur association dans les voies respiratoires supérieures n'est pas forcément signe d'un état clinique. En effet, 71,9% des bovins présentant l'association *P. multocida* / *H. somni* ont été évalués à un score clinique de 0.

D'après la littérature, le modèle de co-infection le plus courant et le mieux documenté chez les bovins, est l'apparition d'une infection virale primaire suivie d'une surinfection bactérienne. Les associations souvent détectées sont notamment *P. multocida* / BPI3, *P. multocida* / BCoV, *H. somni* / BPI3 ou *H. somni* / BRSV (15). Au cours de notre expérience, l'association virus / bactérie n'était pas majoritaire. Sur l'ensemble de nos échantillons coinfectés, seulement 30,6% associent un virus avec une bactérie. Toutefois, nous pouvons retrouver les mêmes associations que dans la littérature comme *P. multocida* / BRSV, *P. multocida* / BPI3, *P. multocida* / BCoV avec des pourcentages respectifs de 8,5%, 5,3% et 5,1%.

Encore une fois, à l'exception des sept veaux de l'exploitation E2 prélevés à J60, nos échantillons n'ont pas été prélevés en période d'épidémie. Cela pourrait expliquer la faible prévalence de co-infection virus / bactérie. Pour les sept veaux malades, nous avons pu mettre en évidence la co-infection *P. multocida* et *M. bovis* pour la majorité des échantillons dont 3 veaux étaient, en plus des bactéries, positifs à BCoV.

Il est également intéressant de remarquer que sur nos résultats d'analyses q-PCR, les virus détectés ont souvent des concentrations élevées (avec des Ct faible < 25) et les bactéries ont des concentrations plus faibles (Ct >30). Ces données pourraient suggérer la présence du modèle infection virale primaire suivie d'une surinfection bactérienne. Afin de valider cette hypothèse, il aurait été intéressant de vérifier, à minima, l'état clinique des bovins pendant la période d'incubation du virus.

2. Circulation de l'IDV dans les élevages laitiers

Lors de nos analyses en virologie, le virus IDV n'a été identifié chez aucun des bovins prélevés. Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'épizooties respiratoires lors des deux années de notre étude, si ce n'est quelque cas dans l'exploitation 2 à J60. Nous ne pouvons donc pas conclure sur un éventuel rôle de IDV en pathologie respiratoire bovine. Une étude française, datant de 2015 avait testé par RT-qPCR 134 échantillons provenant de veaux présentant des signes cliniques de BPI entre 2011 et 2014, et la prévalence obtenue pour le virus IDV était de 4,5% (119). Cette prévalence est relativement faible alors que les bovins présentaient initialement des signes

respiratoires. Il n'est donc pas surprenant de ne trouver aucune trace du virus sur des bovins présentant peu de signes cliniques respiratoires.

En revanche, notre étude nous permet de discuter sur la circulation possible du virus dans nos trois élevages laitiers.

En premier lieu, 39,3% des bovins laitiers testés étaient séropositifs en IHA. Ce pourcentage ne correspond absolument pas à une prévalence mais il indique que le virus était présent à un moment donné dans les exploitations étudiées. Une étude menée en France en 2019 a montré que le virus circule largement sur le territoire avec quelques différences de séroprévalence entre les régions. Par exemple, la prévalence a été évaluée à 70% dans les Pays de la Loire alors qu'elle était de 48,2% en Occitanie. La plupart des sérums analysés lors de cette étude, étaient initialement collectés pour la surveillance de l'IBR. Aucune donnée n'était disponible sur l'historique des maladies respiratoires dans les élevages de chaque région. Ces données sont donc les plus représentatives par rapport à notre expérience (101).

Il est intéressant de remarquer dans notre étude que le titre d'anticorps varie entre les prélèvements de début d'année et de fin d'année. Actuellement, aucune étude n'a encore été réalisée afin de déterminer la durée de vie des anticorps contre les virus Influenza chez les bovins. Chez les humains vaccinés contre la grippe (virus IAV), la persistance des anticorps peut aller de 6 mois à 8 / 9 mois après vaccination (137). Si la durée de persistance des anticorps IDV est d'au moins 6 mois, nous pouvons essayer d'en déduire la circulation du virus dans les exploitations entre chaque date de prélèvements.

Par exemple, pour 100% des bovins testés de l'exploitation E1, et 41% de l'exploitation E3, le taux d'anticorps a diminué en fin d'année. Pour l'exploitation E1 de l'année 1, les résultats ont montré un faible nombre d'animaux positifs à J0 et le déclin total des anticorps à J180. Il est fort possible que le virus ait circulé et contaminé les bovins avant les prélèvements de J0. Il est cependant, peu probable qu'il y ait eu une seconde circulation du virus pendant cette période. Le taux d'anticorps a donc diminué avec le temps.

Au cours de l'année 2, nous pouvons remarquer que les titres moyens en anticorps et le nombre d'animaux séropositifs étaient largement plus importants. Certains bovins

prélevés lors de l'année 1 ont également été prélevés pour l'année 2. Le changement de séropositivité de ces bovins nous laisse imaginer un passage de virus IDV dans l'exploitation, d'une année sur l'autre. Cette exploitation renouvelant son troupeau à partir de son propre cheptel, ce passage du virus ne serait pas dû à l'achat/introduction d'un bovin.

Concernant l'exploitation E2, 100% des bovins ont vu une augmentation de leurs taux d'anticorps à la fin de l'année. Cela signifie que le virus a circulé entre les prélèvements de J60 et J370 et a permis de créer une immunité chez les bovins. Il est difficile de déterminer si l'épisode respiratoire observé à J60 a été déclenché par un passage du virus IDV. Toutefois, cette hypothèse pourrait expliquer la forte séroconversion du troupeau lors de nos prélèvements. Quoi qu'il en soit, lors de nos analyses, nous n'avons pas détecté la présence de ce virus par qPCR. Plusieurs questions peuvent se poser : s'agit-il d'un problème lié aux prélèvements (un nombre insuffisant de veaux malades testés, des prélèvements trop tôt ou trop tard par rapport à l'infection...) ou bien est-ce qu'il y avait réellement une infection à l'IDV.

Pour finir, 59% des bovins de l'exploitation E3 présentent une augmentation du taux d'anticorps entre J0 et J280. L'hypothèse la plus probable serait que le virus a circulé une première fois avant les prélèvements de J0, et il y a eu une seconde circulation infectant, cette fois-ci, quelques bovins. Une seconde contamination aurait permis de stimuler le système immunitaire des bovins en produisant plus d'anticorps et ainsi renforcer leurs défenses immunitaires. Expérimentalement, il a été montré que le virus IDV était capable de réinfecter des veaux quelques semaines après une primo-infection en stimulant la réponse immunitaire humorale (138).

Si nous imaginons, d'un point de vue sérologique, que le virus IDV a probablement circulé plusieurs fois dans les exploitations, les éleveurs, eux, n'ont jamais remarqué sa présence. L'explication probable est que ce virus circule sur le territoire mais son pouvoir pathogène reste assez limité dans les BPI. Expérimentalement, l'infection par IDV chez des veaux naïfs induit des signes cliniques respiratoires légers à modérés (104, 105) : tachypnée, jetage nasal, toux et pour certains veaux dyspnée modérée mais sans atteinte de l'appétit ni de l'état général. On peut supposer que, chez des

veaux immunisés, les signes cliniques soient encore moins importants, ce qui pourrait expliquer l'absence de détection par les éleveurs. IDV seul provoquerait uniquement des manifestations subcliniques ce qui expliquerait que les éleveurs n'aient pas remarqué sa présence. Toutefois il a aussi été montré que lors de co-infection avec *M. bovis*, les signes cliniques respiratoires étaient exacerbés et relativement importants chez les veaux naïfs (102). *M. bovis* était présent dans l'exploitation 2 mais nous n'avons pas pu identifier de co-infection avec IDV.

De plus, il est intéressant de constater dans notre étude que les lots prélevés en veaux, génisses, vaches laitières et vaches tarées ne sont pas forcément localisés au même endroit dans les exploitations. En effet, les veaux et les vaches en lactation sont souvent éloignés des vaches tarées et des génisses. Pourtant, autant les génisses que les bovins adultes ont séroconverti. Seuls les veaux ont généralement moins d'anticorps. Une première explication vient du fait que les vaches en lactation et les vaches tarées sont mélangées au cours de l'année. Ainsi, une contamination par voie directe entre ces deux populations est probable. Une seconde explication est que les éleveurs et le matériel peuvent être un moyen de contamination indirect. La dernière explication est que la contamination du virus IDV peut se faire par voie aéroportée sur de courte distance (103). Cela expliquerait pourquoi les veaux (qui sont généralement éloignés) sont moins touchés par le virus que les adultes (qui sont plus proches géographiquement).

Pour finir, bien que la saisonnalité du virus IDV n'a pas encore été démontrée, il est probable, comme les virus Influenza, que celui-ci circule plutôt en hiver. Or, sur tous nos prélèvements, seulement 3 ont été réalisés entre novembre et janvier. De plus, l'exploitation la plus prélevée en période hivernale est celle ayant eu le moins de séroconversion. Il aurait été intéressant de prélever l'exploitation E3 (exploitation ayant le plus de séroconversion à l'IDV) afin de détecter le virus en virologie.

Durant notre étude, nous avons prélevé des veaux âgés de 1 à 2 mois. D'après de nombreuses études, les veaux présenteraient des anticorps maternels anti-IDV quasi-systématiquement dans leur sérum. À 24 et 36 heures de leur vie, la séroprévalence est de 94%, avec une persistance durant les premiers mois de vie puis une diminution progressive de ces anticorps maternels (99),(100).

Nous pouvons remarquer dans nos prélèvements que la majorité de nos veaux prélevés ne présentaient pas d'anticorps dans les sérums à J0 et donc que les mères étaient séronégatives. Nous n'avons malheureusement pas testé ces vaches en séroconversion. La circulation de l'IDV au sein des élevages ne serait pas constante avec des périodes sans aucune séroconversion pour les mères.

Il serait intéressant de faire un prélèvement sur les futurs veaux des vaches tarées, actuellement positives à la sérologie IDV, afin de connaître le titre d'anticorps que possèdent les veaux à la naissance.

3. Perspectives de l'étude

Notre étude a porté sur plus de 280 bovins issus de trois exploitations laitières. Dans chaque exploitation, huit bovins par lot étaient prélevés. La quantité d'échantillons est assez faible pour pouvoir conclure et généraliser sur la présence ou non d'agents pathogènes dans la population laitière. Nos résultats sont considérés comme des indicateurs pour une base de discussion autant pour les agents pathogènes déjà connus que pour l'IDV.

Bien qu'il n'y a pas eu d'épidémies durant les deux années de prélèvements, des prélèvements tous les mois auraient pu permettre d'obtenir une vue plus précise sur la circulation des agents pathogènes dans les exploitations laitières. De plus, des analyses en période hivernale seraient intéressantes pour de futurs prélèvements dans ces exploitations.

Le score clinique n'a pas pu être réalisé pour l'ensemble des bovins prélevés par manque de main d'œuvre et de temps. Une grande majorité de bovins a été évaluée à un score clinique de 0 car ils ne présentaient pas de signes cliniques. Toutefois, le signe clinique le plus précoce lors des BPI est l'hyperthermie. Ainsi, si la prise de température avait été réalisée à chaque fois sur tous les bovins, on aurait peut-être pu avoir des scores cliniques différents.

Pour finir, les trois exploitations laitières étudiées font partie du sud de la France, dans deux régions. Ainsi, afin d'avoir une vision plus représentative de la population laitière sur le territoire, un échantillonnage de plusieurs régions françaises pourrait être intéressant.

V. Conclusion

Le but de notre étude était dans un premier temps, d'avoir une première évaluation de la fréquence et l'impact du virus IDV dans les élevages laitiers. En parallèle, la recherche des principaux agents pathogènes, déjà connus comme étant impliqués dans le développement de BPI, a été réalisée.

Ces analyses nous ont permis de mettre en évidence la bactérie *Pasteurella multocida* comme étant le principal agent infectieux retrouvés dans notre échantillonnage. Autant chez les veaux que chez les adultes, la présence de cette bactérie n'implique pas forcément des signes cliniques. *Histophilus somni* a également été présent au cours de notre étude avec peu de signes cliniques associés. L'existence de ces deux bactéries suggère que les bovins laitiers de notre échantillonnage possèdent une flore commensale composée de Pasteurelles.

La présence de co-infection lors de BPI est aujourd'hui démontrée. Néanmoins, très peu d'association d'agents pathogènes ont été révélés dans nos échantillons. Ce phénomène peut être dû à l'absence de pathologie respiratoire sur les bovins prélevés durant notre étude. Nous pouvons donc suggérer que la présence d'agents pathogènes en coexistence serait davantage associée à des maladies respiratoires que les pathogènes seuls.

De plus, du fait du peu d'échantillons présentant des co-infections, il est difficile d'affirmer que la présence de plusieurs pathogènes entraîne une augmentation des signes cliniques. Toutefois, la présence de certains virus comme le BRSV en association avec des bactéries a montré une augmentation du score clinique des bovins infectés.

Pour finir, nous n'avons pas obtenu de résultat positif lors de la recherche du virus IDV. Toutefois, les bovins prélevés ont révélé la présence d'anticorps suggérant la circulation de ce virus au sein des élevages. Au vu des titres d'anticorps obtenus, il est probable que le virus ait circulé plusieurs fois, silencieusement, dans les exploitations. Ainsi, d'après notre étude, le pouvoir pathogène de l'IDV sur les bovins laitiers semble être assez faible. Toutefois, il serait intéressant d'augmenter notre échantillonnage afin d'avoir une vision globale de l'impact de ce virus dans élevages laitiers français.

VI. Bibliographie

1. Cho Y il, Yoon KJ. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci.* mars 2014;15(1):1-17.
2. Blakebrough-Hall C, McMeniman JP, González LA. An evaluation of the economic effects of bovine respiratory disease on animal performance, carcass traits, and economic outcomes in feedlot cattle defined using four BRD diagnosis methods. *J Anim Sci.* 1 févr 2020;98(2):skaa005.
3. Timsit E, Assié S, Quiniou R, Seegers H, Bareille N. Early detection of bovine respiratory disease in young bulls using reticulo-rumen temperature boluses. *Vet J Lond Engl* 1997. oct 2011;190(1):136-42.
4. Hodgins DC, Conlon JA, Shewen PE. Respiratory Viruses and Bacteria in Cattle. In: *Polymicrobial Diseases* [Internet]. ASM Press; 2002 [cité 26 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2480/>
5. Smith DR. Risk factors for bovine respiratory disease in beef cattle. *Anim Health Res Rev.* déc 2020;21(2):149-52.
6. Caswell JL. Failure of respiratory defenses in the pathogenesis of bacterial pneumonia of cattle. *Vet Pathol.* mars 2014;51(2):393-409.
7. Pfister H. Caractérisation des expositions professionnelles des éleveurs laitiers bretons : déterminants professionnels de l'exposition à la fraction thoracique des bioaérosols, à l'ammoniac et à l'acétaldéhyde, et effets inflammatoires des poussières organiques [Internet] [phdthesis]. Université de Rennes; 2017 [cité 1 juin 2023]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-01830189>
8. FRANCOZ D, COUTURE Y. Manuel de Médecine des Bovins [Internet]. 2014 [cité 1 juin 2023]. Disponible sur: <https://librairie.vetbooks.fr/manuel-medecine-bovins-9782354031862-c2x32207684>
9. Valarcher JF, Hägglund S. VIRAL RESPIRATORY INFECTIONS IN CATTLE. 2006 [cité 26 mai 2023]; Disponible sur: <http://rgdoi.net/10.13140/2.1.1473.1524>
10. Corbeil LB, Watt B, Corbeil RR, Betzen TG, Brownson RK, Morrill JL. Immunoglobulin concentrations in serum and nasal secretions of calves at the onset of pneumonia. *Am J Vet Res.* avr 1984;45(4):773-8.
11. Larsen LE. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Vet Scand.* 2000;41(1):1-24.
12. Lorenza Richard RM. L'aspiration transtrachéale est un bon compromis lors d'affection respiratoire -. *Sem Vét* [Internet]. 3 oct 2014 [cité 28 mai 2023]; PRODUCTIONS ANIMALES/BOVINS(n° 1599). Disponible sur: <https://www.lepointveterinaire.fr/publications/la-semaine-veterinaire/article/n-1599/l-aspiration-transtracheale-est-un-bon-compromis-lors-d-affection-respiratoire.html>
13. Kimman TG, Straver PJ, Zimmer GM. Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: morphologic and serologic findings. *Am J Vet Res.* mai 1989;50(5):684-93.

14. Westenbrink F, Kimman TG, Brinkhof JM. Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves. *J Gen Virol.* mars 1989;70 (Pt 3):591-601.
15. Gaudino M. Interactions between respiratory coinfecting pathogens in cattle: impact on pathogens evolution and respiratory disease complex severity [Infectiologie, Physio-pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition]. [Toulouse]: Toulouse, INPT; 2022.
16. Ellis JA. Update on viral pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev.* déc 2009;10(2):149-53.
17. Confer AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev.* déc 2009;10(2):145-8.
18. Perrin, B., Dannacher, G., and Solsona, M. Mise en évidence des anticorps contre le virus respiratoire syncytial chez les bovins français. *Recl Med Veterinaire.* 1979;155, 465-471.
19. Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, Crouch S, Jebbett J, Smith GS, et al. A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hyg (Lond).* oct 1980;85(2):257-70.
20. Kimman TG, Zimmer GM, Westenbrink F, Mars J, van Leeuwen E. Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease. *Vet Rec.* 23 juill 1988;123(4):104-9.
21. Luzzago C, Bronzo V, Salvetti S, Frigerio M, Ferrari N. Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds. *Vet Res Commun.* janv 2010;34(1):19-24.
22. Berge AC, Jozan T, Levesque C, Vertenten G. A Field Study Evaluating Humoral Immunity in Calves Vaccinated with Multivalent Bovine Respiratory Pathogen Vaccines. *Folia Vet.* 1 déc 2021;65(4):20-30.
23. Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Løken T, Akerstedt J, Østerås O. Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci.* oct 2009;92(10):5139-46.
24. Adaptation du programme IBR à la LSA [Internet]. [cité 4 août 2023]. Disponible sur: https://eurl-staphilococi.anses.fr/fr/system/files/1_JNRP_10_02_2022_IBR_gestion.pdf
25. C.A. MEBUS, E. L. STAIR, M. B. RHODES and M. J. TWIEHAU. Pathology of Neonatal Calf Diarrhea Induced by a Coronavirus-Like Agent [Internet]. [cité 28 mai 2023]. Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1177/030098587301000105>
26. Thomas LH, Gourlay RN, Stott EJ, Howard CJ, Bridger JC. A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves. *Res Vet Sci.* 1 sept 1982;33(2):170-82.
27. Beaudeau F, Björkman C, Alenius S, Frössling J. Spatial patterns of bovine corona virus and bovine respiratory syncytial virus in the Swedish beef cattle population. *Acta Vet Scand.* 21 mai 2010;52(1):33.
28. Häggglund S, Svensson C, Emanuelson U, Valarcher JF, Alenius S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *Vet J Lond Engl* 1997. sept 2006;172(2):320-8.

29. Saxegaard F, Bratberg B. Isolation of Bovine Adenovirus Type 1 from a Calf with Pneumo-Enteritis. *Acta Vet Scand.* 1971;12(3):464-6.
30. Aldasy P, Csontos L, Bartha A. PNEUMO-ENTERITIS IN CALVES CAUSED BY ADENOVIRUSES. *Acta Vet Acad Sci Hung.* 1965;15:167-75.
31. Shen Y, Liu J, Zhang Y, Ma X, Yue H, Tang C. Prevalence and characteristics of a novel bovine adenovirus type 3 with a natural deletion fiber gene. *Infect Genet Evol.* 1 sept 2020;83:104348.
32. Krzysiak MK, Jabłoński A, Iwaniak W, Krajewska M, Kęsik-Maliszewska J, Larska M. Seroprevalence and risk factors for selected respiratory and reproductive tract pathogen exposure in European bison (*Bison bonasus*) in Poland. *Vet Microbiol.* févr 2018;215:57-65.
33. Härtel H, Nikunen S, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivelä SL, Aho R, et al. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Vet Scand.* 2004;45(3-4):193-200.
34. Yeşilbağ K, Güngör B. Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey. *Trop Anim Health Prod.* janv 2008;40(1):55-60.
35. Timsit E, Christensen H, Bareille N, Seegers H, Bisgaard M, Assié S. Transmission dynamics of *Mannheimia haemolytica* in newly-received beef bulls at fattening operations. *Vet Microbiol.* 25 janv 2013;161(3):295-304.
36. Catry B, Govaere JLJ, Devriese L, Laevens H, Haesebrouck F, Kruif A de. Bovine enzootic bronchopneumonia: prevalence of pathogens and its antimicrobial susceptibility. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr.* 2002;71(5):348-54.
37. Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, et al. Diseases and Pathogens Associated with Mortality in Ontario Beef Feedlots. *J Vet Diagn Invest.* 1 janv 2006;18(1):18-28.
38. Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* déc 2007;8(2):117-28.
39. Klein U, De Jong A, Youala M, El Garch F, Stevenin C, Moyaert H, et al. New antimicrobial susceptibility data from monitoring of *Mycoplasma bovis* isolated in Europe. *Vet Microbiol.* nov 2019;238:108432.
40. Valarcher JF, Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res.* mars 2007;38(2):153-80.
41. Sarmiento-Silva R, Nakamura-Lopez Y, Vaughan G. Epidemiology, Molecular Epidemiology and Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus. *Viruses.* 30 nov 2012;4(12):3452-67.
42. Grell SN, Riber U, Tjørnehøj K, Larsen LE, Heegaard PMH. Age-dependent differences in cytokine and antibody responses after experimental RSV infection in a bovine model. *Vaccine.* 16 mai 2005;23(26):3412-23.
43. Ellis JA. Bovine Parainfluenza-3 Virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1 nov 2010;26(3):575-93.

44. Sobhy NM, Mor SK, Bastawecy IM, Fakhry HM, Youssef CRB, Goyal SM. Surveillance, isolation and complete genome sequence of bovine parainfluenza virus type 3 in Egyptian cattle. *Int J Vet Sci Med.* 1 juin 2017;5(1):8-13.
45. THOMAS A, MAINIL J, LINDEN A. *Mycoplasma bovis* : synthèse des connaissances actuelles. *Bactériologie Dép Mal Infect Parasit.* 6 janv 2003;17.
46. Arcangioli MA, Duet A, Meyer G, Dernburg A, Bézille P, Poumarat F, et al. The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *Vet J.* 1 juill 2008;177(1):89-93.
47. Lysnyansky I, Ron Y, Yogev D. Juxtaposition of an active promoter to vsp genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in *Mycoplasma bovis*. *J Bacteriol.* oct 2001;183(19):5698-708.
48. Larsen J, Pedersen AG, Davies RL, Kuhnert P, Frey J, Christensen H, et al. Evolution of the leukotoxin promoter in genus *Mannheimia*. *BMC Evol Biol.* 29 mai 2009;9:121.
49. Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim Health Res Rev.* déc 2007;8(2):187-205.
50. Saif LJ. Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* juill 2010;26(2):349-64.
51. Oma VS, Tråvén M, Alenius S, Myrmel M, Stokstad M. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virol J.* 13 juin 2016;13(1):100.
52. Mattson DE, Norman BB, Dunbar JR. Bovine adenovirus type-3 infection in feedlot calves. *Am J Vet Res.* janv 1988;49(1):67-9.
53. Narita M, Yamada M, Tsuboi T, Kawashima K. Immunohistopathology of calf pneumonia induced by endobronchial inoculation with bovine adenovirus 3. *Vet Pathol.* sept 2002;39(5):565-71.
54. Zemke NR, Berk AJ. The Adenovirus E1A C Terminus Suppresses a Delayed Antiviral Response and Modulates RAS Signaling. *Cell Host Microbe.* 13 déc 2017;22(6):789-800.e5.
55. Ridpath J. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* juill 2010;26(2):335-48.
56. Ellis JA, West KH, Cortese VS, Myers SL, Carman S, Martin KM, et al. Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhoea virus-type II. *Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire.* juill 1998;62(3):161-9.
57. Chase CCL, Thakur N, Darweesh MF, Morarie-Kane SE, Rajput MK. Immune response to bovine viral diarrhoea virus--looking at newly defined targets. *Anim Health Res Rev.* juin 2015;16(1):4-14.
58. Martel JL, Meunier D, Chalus-Dancla E. Les pasteurelloses bovines : évolution du groupe bactérien, importance de l'antibiorésistance. *Bull Académie Vét Fr.* 2002;155(3):303-12.

59. Sellyei B, Rónai Z, Jánosi S, Makrai L. Comparative analysis of *Pasteurella multocida* strains isolated from bovine respiratory infections. *Acta Microbiol Immunol Hung*. déc 2015;62(4):453-61.
60. Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett*. déc 2006;265(1):1-10.
61. Pérez DS, Pérez FA, Bretschneider G. *Histophilus somni*: pathogenicity in cattle an update. *An Vet Murcia*. 2010;26:5-21.
62. Corbeil LB. *Histophilus somni* host-parasite relationships. *Anim Health Res Rev*. déc 2007;8(2):151-60.
63. Headley SA, Okano W, Balbo LC, Marcasso RA, Oliveira TE, Alfieri AF, et al. Molecular survey of infectious agents associated with bovine respiratory disease in a beef cattle feedlot in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest*. 1 mars 2018;30(2):249-51.
64. Saegerman C, Gaudino M, Savard C, Broes A, Ariel O, Meyer G, et al. Influenza D virus in respiratory disease in Canadian, province of Québec, cattle: Relative importance and evidence of new reassortment between different clades. *Transbound Emerg Dis*. mai 2022;69(3):1227-45.
65. Pelletier C. Apport des outils de diagnostic moléculaire dans le diagnostic des pathologies multifactorielles. SNGTV [Internet]. *Bull des GTV*. 2011;(61):37–45. [cité 5 juin 2023]; Disponible sur: <https://www2.sngtv.org/article-bulletin/apport-des-outils-de-diagnostic-moleculaire-dans-le-diagnostic-des-pathologies-multifactorielles/>
66. Gallo RL. *S. epidermidis* Influence on Host Immunity: More Than Skin Deep. *Cell Host Microbe*. 11 févr 2015;17(2):143-4.
67. Pardon B, Buczinski S. Bovine Respiratory Disease Diagnosis: What Progress Has Been Made in Infectious Diagnosis? *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. juill 2020;36(2):425-44.
68. Oliva J, Terrier O. Viral and Bacterial Co-Infections in the Lungs: Dangerous Liaisons. *Viruses*. sept 2021;13(9):1725.
69. Baker JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. nov 1995;11(3):425-45.
70. Sudaryatma PE, Nakamura K, Mekata H, Sekiguchi S, Kubo M, Kobayashi I, et al. Bovine respiratory syncytial virus infection enhances *Pasteurella multocida* adherence on respiratory epithelial cells. *Vet Microbiol*. juill 2018;220:33-8.
71. Sudaryatma PE, Mekata H, Kubo M, Subangkit M, Goto Y, Okabayashi T. Co-infection of epithelial cells established from the upper and lower bovine respiratory tract with bovine respiratory syncytial virus and bacteria. *Vet Microbiol*. août 2019;235:80-5.
72. Fahkrajang W, Sudaryatma PE, Mekata H, Hamabe S, Saito A, Okabayashi T. Bovine respiratory coronavirus enhances bacterial adherence by upregulating expression of cellular receptors on bovine respiratory epithelial cells. *Vet Microbiol*. avr 2021;255:109017.
73. Agnes JT, Zekarias B, Shao M, Anderson ML, Gershwin LJ, Corbeil LB. Bovine respiratory syncytial virus and *Histophilus somni* interaction at the alveolar barrier. *Infect*

Immun. juill 2013;81(7):2592-7.

74. Gershwin LJ, Berghaus LJ, Arnold K, Anderson ML, Corbeil LB. Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 15 août 2005;107(1-2):119-30.
75. McGill JL, Rusk RA, Guerra-Maupome M, Briggs RE, Sacco RE. Bovine Gamma Delta T Cells Contribute to Exacerbated IL-17 Production in Response to Co-Infection with Bovine RSV and *Mannheimia haemolytica*. *PLOS ONE.* 4 mars 2016;11(3):e0151083.
76. Ridpath JF, Fulton RW, Bauermann FV, Falkenberg SM, Welch J, Confer AW. Sequential exposure to bovine viral diarrhoea virus and bovine coronavirus results in increased respiratory disease lesions: clinical, immunologic, pathologic, and immunohistochemical findings. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* juill 2020;32(4):513-26.
77. Elvander M, Baule C, Persson M, Egyed L, Ballagi-Pordány A, Belák S, et al. An experimental study of a concurrent primary infection with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in calves. *Acta Vet Scand.* 1998;39(2):251-64.
78. Risalde MA, Molina V, Sánchez-Cordón PJ, Romero-Palomo F, Pedrera M, Gómez-Villamandos JC. Effects of Preinfection With Bovine Viral Diarrhoea Virus on Immune Cells From the Lungs of Calves Inoculated With Bovine Herpesvirus 1.1. *Vet Pathol.* juill 2015;52(4):644-53.
79. Chase CCL. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biol J Int Assoc Biol Stand.* janv 2013;41(1):52-60.
80. Pollreisz JH, Kelling CL, Brodersen BW, Perino LJ, Cooper VL, Doster AR. Potentiation of bovine respiratory syncytial virus infection in calves by bovine viral diarrhoea virus | *The Bovine Practitioner.* 1997 [cité 5 juin 2023]; Disponible sur: <https://bovine-ojs-tamu.tdl.org/bovine/article/view/1492>
81. Liu L, Lehmkuhl HD, Kaeberle ML. Synergistic effects of bovine respiratory syncytial virus and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection on selected bovine alveolar macrophage functions. *Can J Vet Res.* janv 1999;63(1):41-8.
82. Risalde MA, Molina V, Sánchez-Cordón PJ, Pedrera M, Panadero R, Romero-Palomo F, et al. Response of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in calves with subclinical bovine viral diarrhoea challenged with bovine herpesvirus-1. *Vet Immunol Immunopathol.* 15 nov 2011;144(1):135-43.
83. Gaudino M, Nagamine B, Ducatez MF, Meyer G. Understanding the mechanisms of viral and bacterial coinfections in bovine respiratory disease: a comprehensive literature review of experimental evidence. *Vet Res.* 6 sept 2022;53(1):70.
84. Corbeil LB, Woodward W, Ward AC, Mickelsen WD, Paisley L. Bacterial interactions in bovine respiratory and reproductive infections. *J Clin Microbiol.* mai 1985;21(5):803-7.
85. Bavananthasivam J, Dassanayake RP, Kugadas A, Shanthalingam S, Call DR, Knowles DP, et al. Proximity-dependent inhibition of growth of *Mannheimia haemolytica* by *Pasteurella multocida*. *Appl Environ Microbiol.* sept 2012;78(18):6683-8.

86. Amat S, Subramanian S, Timsit E, Alexander TW. Probiotic bacteria inhibit the bovine respiratory pathogen *Mannheimia haemolytica* serotype 1 in vitro. *Lett Appl Microbiol*. mai 2017;64(5):343-9.
87. Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de León A, Sanchez-Flores A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet*. 2015;6:348.
88. Pillai S, Gopalan V, Lam AKY. Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1 août 2017;116:58-67.
89. Miyamoto M, Motooka D, Gotoh K, Imai T, Yoshitake K, Goto N, et al. Performance comparison of second- and third-generation sequencers using a bacterial genome with two chromosomes. *BMC Genomics*. 21 août 2014;15(1):699.
90. Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G. Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. janv 2013;19(1):15-22.
91. Edwards RA, Rohwer F. Viral metagenomics. *Nat Rev Microbiol*. juin 2005;3(6):504-10.
92. Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol*. 1 févr 2012;2(1):63-77.
93. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, et al. Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses. Fouchier RAM, éditeur. *PLoS Pathog*. 7 févr 2013;9(2):e1003176.
94. Su S, Fu X, Li G, Kerlin F, Veit M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*. 25 août 2017;8(8):1580-91.
95. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, et al. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the *Orthomyxoviridae* Family. Palese P, éditeur. *mBio*. mai 2014;5(2):e00031-14.
96. Odagiri T, Ishida H, Li JY, Endo M, Kobayashi T, Kamiki H, et al. Antigenic heterogeneity among phylogenetic clusters of influenza D viruses. *J Vet Med Sci*. 2018;80(8):1241-4.
97. Asha K, Kumar B. Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *J Clin Med*. 5 févr 2019;8(2):192.
98. Eckard L. Assessment of the Zoonotic Potential of a Novel Bovine Influenza Virus. Theses Diss ETD [Internet]. 1 mai 2016; Disponible sur: <https://dc.uthsc.edu/dissertations/388>
99. Luo J, Ferguson L, Smith DR, Woolums AR, Epperson WB, Wan XF. Serological evidence for high prevalence of Influenza D Viruses in Cattle, Nebraska, United States, 2003-2004. *Virology*. 15 janv 2017;501:88-91.
100. Ferguson L, Eckard L, Epperson WB, Long LP, Smith D, Huston C, et al. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology*. déc 2015;486:28-34.

101. Oliva J. Eco-épidémiologie du virus influenza D: évaluation du spectre d'hôtes et du risque d'émergence.
102. Lion A, Secula A, Raçon C, Boulesteix O, Pinard A, Deslis A, et al. Enhanced Pathogenesis Caused by Influenza D Virus and *Mycoplasma bovis* Coinfection in Calves: a Disease Severity Linked with Overexpression of IFN- γ as a Key Player of the Enhanced Innate Immune Response in Lungs. Kibenge FSB, éditeur. *Microbiol Spectr*. 22 déc 2021;9(3):e01690-21.
103. Salem E. Bronchopneumonies infectieuses des jeunes bovins: de la complexité du microbiome aux particularités évolutives et cliniques de virus respiratoires encore méconnus. [Toulouse]: Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP); 2018.
104. Ferguson L, Olivier AK, Genova S, Epperson WB, Smith DR, Schneider L, et al. Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle. Perlman S, éditeur. *J Virol*. 15 juin 2016;90(12):5636-42.
105. Salem E, Hägglund S, Cassard H, Corre T, Näslund K, Foret C, et al. Pathogenesis, Host Innate Immune Response, and Aerosol Transmission of Influenza D Virus in Cattle. *J Virol*. 21 mars 2019;93(7):e01853-18.
106. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog*. févr 2013;9(2):e1003176.
107. Lee J, Wang L, Palinski R, Walsh T, He D, Li Y, et al. Comparison of Pathogenicity and Transmissibility of Influenza B and D Viruses in Pigs. *Viruses*. 27 sept 2019;11(10):905.
108. Quast M, Sreenivasan C, Sexton G, Nedland H, Singrey A, Fawcett L, et al. Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. *Vet Microbiol*. 18 nov 2015;180(3-4):281-5.
109. Oliva J, Eichenbaum A, Belin J, Gaudino M, Guillotin J, Alzieu JP, et al. Serological Evidence of Influenza D Virus Circulation Among Cattle and Small Ruminants in France. *Viruses*. 5 juin 2019;11(6):516.
110. Robinson E, Schulein C, Jacobson BT, Jones K, Sago J, Huber V, et al. Pathophysiology of Influenza D Virus Infection in Specific-Pathogen-Free Lambs with or without Prior *Mycoplasma ovipneumoniae* Exposure. *Viruses*. 28 juin 2022;14(7):1422.
111. Nedland H, Wollman J, Sreenivasan C, Quast M, Singrey A, Fawcett L, et al. Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States. *Zoonoses Public Health*. févr 2018;65(1):e148-54.
112. Sreenivasan CC, Uprety T, Reedy SE, Temeeyasen G, Hause BM, Wang D, et al. Experimental Infection of Horses with Influenza D Virus. *Viruses*. 23 mars 2022;14(4):661.
113. Salem E, Cook EAJ, Lbacha HA, Oliva J, Awoume F, Aplogan GL, et al. Serologic Evidence for Influenza C and D Virus among Ruminants and Camelids, Africa, 1991–2015. *Emerg Infect Dis*. sept 2017;23(9):1556-9.
114. Murakami S, Odagiri T, Melaku SK, Bazartseren B, Ishida H, Takenaka-Uema A, et al. Influenza D Virus Infection in Dromedary Camels, Ethiopia. *Emerg Infect Dis*. juin 2019;25(6):1224-6.

115. Ferguson L, Luo K, Olivier AK, Cunningham FL, Blackmon S, Hanson-Dorr K, et al. Influenza D Virus Infection in Feral Swine Populations, United States. *Emerg Infect Dis.* juin 2018;24(6):1020-8.
116. Guan M, Jacobson O, Sarafianos G, Baroch J, Deliberto TJ, Wan XF. Exposure of white-tailed deer in North America to influenza D virus. *Virology.* 1 août 2022;573:111-7.
117. White SK, Ma W, McDaniel CJ, Gray GC, Lednicky JA. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* août 2016;81:31-3.
118. Trombetta CM, Marchi S, Manini I, Kistner O, Li F, Piu P, et al. Influenza D Virus: Serological Evidence in the Italian Population from 2005 to 2017. *Viruses.* 27 déc 2019;12(1):30.
119. Ducatez MF, Pelletier C, Meyer G. Influenza D Virus in Cattle, France, 2011–2014. *Emerg Infect Dis.* févr 2015;21(2):368-71.
120. Foni E, Chiapponi C, Baioni L, Zanni I, Merenda M, Rosignoli C, et al. Influenza D in Italy: towards a better understanding of an emerging viral infection in swine. *Sci Rep.* 15 sept 2017;7:11660.
121. Trombetta CM, Montomoli E, Di Bartolo I, Ostanello F, Chiapponi C, Marchi S. Detection of antibodies against influenza D virus in swine veterinarians in Italy in 2004. *J Med Virol.* juin 2022;94(6):2855-9.
122. Tissot A. Caractérisation Structurale et Biochimique de la Nucléoprotéine des virus grippaux de type A, B et D [Internet] [PhD Thesis]. [Grenoble, Alpes]; 2017. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2017GREAV014/document>
123. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, et al. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the *Orthomyxoviridae* Family. *Palese P, éditeur. mBio.* mai 2014;5(2):e00031-14.
124. Salem E. Bronchopneumonies infectieuses des jeunes bovins: de la complexité du microbiome aux.
125. Song H, Qi J, Khedri Z, Diaz S, Yu H, Chen X, et al. An Open Receptor-Binding Cavity of Hemagglutinin-Esterase-Fusion Glycoprotein from Newly-Identified Influenza D Virus: Basis for Its Broad Cell Tropism. *PLoS Pathog.* 27 janv 2016;12(1):e1005411.
126. Yu J, Hika B, Liu R, Sheng Z, Hause BM, Li F, et al. The Hemagglutinin-Esterase Fusion Glycoprotein Is a Primary Determinant of the Exceptional Thermal and Acid Stability of Influenza D Virus. *mSphere.* 9 août 2017;2(4):e00254-17.
127. Hutchinson EC, Fodor E. Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. *Vaccine.* 7 déc 2012;30(51):7353-8.
128. Knipe DM, Howley PM. *Fields' Virology.* 5th ed. Vol. QR360.V5125. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 3116 p.
129. Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RWH, Baudin F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* mars 2007;124(1-2):12-21.

130. Samji T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale J Biol Med.* déc 2009;82(4):153-9.
131. Ferguson L, Olivier AK, Genova S, Epperson WB, Smith DR, Schneider L, et al. Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle. Perlman S, éditeur. *J Virol.* 15 juin 2016;90(12):5636-42.
132. Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog.* janv 2013;9(1):e1003057.
133. Zhang X, Outlaw C, Olivier AK, Woolums A, Epperson W, Wan XF. Pathogenesis of co-infections of influenza D virus and *Mannheimia haemolytica* in cattle. *Vet Microbiol.* avr 2019;231:246-53.
134. Saegerman C, Salem E, Ait Lbacha H, Alali S, Zouagui Z, Meyer G, et al. Formal estimation of the seropositivity cut-off of the hemagglutination inhibition assay in field diagnosis of influenza D virus in cattle and estimation of the associated true prevalence in Morocco. *Transbound Emerg Dis.* mai 2021;68(3):1392-9.
135. Jánosi K, Stipkovits L, Glávits R, Molnár T, Makrai L, Gyuranecz M, et al. Aerosol infection of calves with *Histophilus somni*. *Acta Vet Hung.* sept 2009;57(3):347-56.
136. Zhang M, Hill JE, Godson DL, Ngeleka M, Fernando C, Huang Y. The pulmonary virome, bacteriological and histopathological findings in bovine respiratory disease from western Canada. *Transbound Emerg Dis.* mars 2020;67(2):924-34.
137. Dhennin L. Les gripes humaines et animales. *Bull Académie Vét Fr.* 1984;137(3):337-40.
138. Wan XF, Ferguson L, Oliva J, Rubrum A, Eckard L, Zhang X, et al. Limited Cross-Protection Provided by Prior Infection Contributes to High Prevalence of Influenza D Viruses in Cattle. *J Virol.* 31 août 2020;94(18):e00240-20.

Annexes

Annexe 1 : Protocole du projet PREVENTER

Longitudinal study in cattle farms

1- Selection of cattle farms:

For IDV surveillance, the selection of two dairy cattle farms with respiratory problems for which IDV circulation has previously been reported is envisaged. The selected farms must comply with the animal welfare standards provided for by current national legislation.

The owners of the selected farms will be required to sign an informed consent on the purposes and activities carried out within the project and on the use of the biological samples taken.

During all phases of the project, the owner's complete anonymity will be guaranteed and he will also be informed of the results of the laboratory tests performed within the project.

2- Sampling:

A total of 128 samples will be collected on a two-years period. In each farm, 32 animals with respiratory symptoms per year will be sampled collecting blood and nasal swabs.

Sampling will be stratified between different age groups and categories representative of the animal population of the farm and nasal swabs and blood will be collected from each animal. The samples will be analyzed for both IDV genome and antibody detection and will also be analyzed for other main respiratory pathogens in order to better investigate the role of IDV in the "bovine respiratory disease complex" and to evaluate the most common co-infections.

Sampling in the two selected companies will be carried out as follows:

- A total of 64 animals with clinical respiratory form will be selected in each farm for a period of two years. The animals will be chosen from all age categories present in the farm for a total of 16 calves, 16 young heifers, 16 heifers and 16 lactating cows per farm as shown in Figure 1.

- Collection of nasal swabs and blood from each animal with a respiratory clinical form. The samples provided in the investigated farms will not interfere with any necessary therapeutic or vaccination treatments, which will in any case be carried out according to the schedules defined by the company veterinarian.

Sampling protocol for the first year of observation

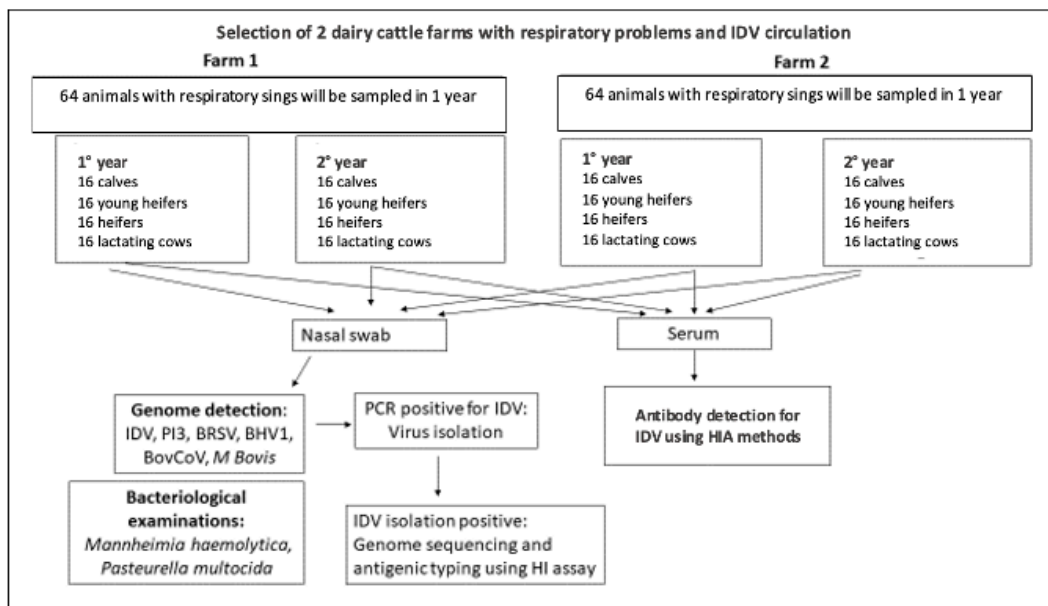


Figure 1

Farms without respiratory signs at the time of sampling:

32 representative animals of all four age groups will be sampled (nasal swabs and blood samples) at the beginning of the winter season before respiratory signs appear for each of the two selected farms to get an idea of the health situation at the beginning.

In the event that no clinical signs are observed during the first observation year, the remaining number of samples (n.32) will be collected randomly at the end of the season from representative animals of all the categories at the end of the season.

At the end of the season if respiratory signs are observed, samples will be taken from sick animals but some samples will also be collected from healthy animals representative of all age groups.

Farms with respiratory signs at the time of sampling:

In case of presence of respiratory signs at the time of collection (early winter season), 32 samples (nasal swabs and blood samples) from representative animals of all age groups will be collected, divided into about half animals with respiratory signs and half healthy animals.

The remaining samples will be taken at the end of the season from the same sick animals (if possible) and from other healthy animals, not necessarily the same animals as before.

Description of respiratory signs:

The following clinical scoring system will be used to harmonized clinical data collection:

Clinical score:**Temperature scores:**

< 39° = 0

39-40 = 1

40-40,9 = 2

< 41 = 3

cow's respiratory rate (breaths per minute):

<35 = 0

35-40 = 1

40-60 = 2

60-80 = 3

>80 = 4

Cough severity scores:

Frequency: Absent: 0, moderate=1, frequent=2

Intensity: RAS= 0, moderate =1, strong =2

Nasal discharge scores:

Absent=0; seromucous = 1; mucopurulent=2

Grade for dyspnea:

Absent = 0; present = 2

Breathing sounds:

Normal = 0, Reinforced = 1, Reinforced and additional = 2

Food refusal scores:

Absent=0, partial =1, total=2

Behavior Score:

Normal=0, sad (slight change) =1; very depressed, decubitus = 2

Annexe 2 : Co-infections en fonction du stade physiologique des bovins dans chaque exploitation

Lors des prélèvements à J0, nous pouvons remarquer que 25 bovins sur les 32 prélevés (46,8%) présentent une mono-infection et 4 bovins (12,5%) présentent une co-infection avec deux agents pathogènes. Pour les prélèvements de fin d'année, 10 bovins sur les 29 prélevés (34,5%) présentent une mono-infection, et 7% (2 bovins sur 29) présentent une co-infection avec deux agents pathogènes.

En effet, les résultats de nos premiers prélèvements nous indiquent que pour 87,5% des veaux positifs, 71,4% (soit 5 veaux sur 7) présentent une mono-infection. Les deux derniers veaux présentent une co-infection avec deux agents pathogènes (*P. multocida* / *H. somni* et *P. multocida* / *M. bovis*).

Concernant les vaches en lactation, 67% des bovins positifs ont une mono-infection à *P. multocida* et 33% ont une poly-infection entre *P. multocida* et *H. somni*.

Pour les vaches en tarissement, les 3 bovins testés positifs ont révélé seulement une mono-infection à *P. multocida*.

Concernant les génisses, 5 bovins développent une mono-infection sur 6 bovins testés positifs (83%). Le seul bovin présentant une co-infection s'est révélé être positif à *P. multocida* et à *H. somni*.

Pour les prélèvements en fin d'année, nous pouvons remarquer que 75% des veaux positifs ont été identifiés avec une mono-infection et seulement 1 veau sur 4 a une co-infection avec *P. multocida* et *H. somni*.

Pour les vaches en lactation et les vaches tarées, la totalité de l'échantillon (100%) a une mono-infection à *P. multocida* lors du dernier prélèvement.

Pour les génisses, sur 3 bovins testés positifs, 1 seul a contracté une co-infection avec *P. multocida* et *H. somni*.

		Année 1													
E1		J0 (14/12/2021)						J180 (14/06/2022)							
		IDV	BCoV	BRSV	BPI3	M. bovis	P. multocida	H. somni	IDV	BCoV	BRSV	BPI3	M. bovis	P. multocida	H. somni
Vaches en Lactation	1														
	2														
	3														
	4												33,11		
	5						35,99							35,48	
	6						32,92								
	7												34,4		
	8						35,69	34,7					35,69		
Génisses	9					35,7							36,68		
	10														
	11							33,11					35,8	36,68	
	12														
	13						34,4								
	14						35,79	35,8							
	15						29,04							36,37	
	16						35,16								
Vaches Taries	17								Sortie						
	18								Sortie						
	19						35,24								
	20														
	21						33,98						31,54		
	22						35,61								
	23								Sortie						
	24														
Veaux	25						33,15								
	26												32,4		
	27						33,6								
	28					35,3		33,45							
	29						24,91						26,59	33,24	
	30						33,77						32,39		
	31						35,61	35,29					25,33		
	32						26,59								

Code couleur	valeur Ct
35-40	
30-35	
25-30	
20-25	
15-20	

Tableau 8: Résultat q-PCR (en Ct) des EN dans l'exploitation E1 année 1

Le tableau 6 nous donne les résultats obtenus pour l'exploitation E1, lors de la deuxième année.

Nous constatons, en comparaison avec l'année 1, que le nombre de bovins présentant des agents pathogènes est largement plus élevé.

Lors des prélèvements à J0, 24 bovins sur les 32 prélevés (75%) révèlent une mono-infection et 8 bovins (25%) possèdent une co-infection avec deux agents pathogènes. Pour les prélèvements à J280, 14 bovins sur les 25 prélevés (56%) présentent une mono-infection, 28% (7 bovins sur 25) présentent une co-infection avec deux agents pathogènes et 2 bovins sur 25 (8%) une co-infection avec trois agents pathogènes.

Toutefois, en début ou en fin d'année, l'infection que l'on retrouve le plus souvent est la mono-infection à *P. multocida*. À J0, nous avons 50% de vaches en lactation, 100% de génisses, 87,5% de vaches taries et 50% de veaux mono-infecté dans les échantillons.

En fin d'année, 37,5% des vaches taries, et 62,5% des veaux sont mono-infectés à *P. multocida*. Chez les vaches en lactation, le lot sélectionné présente seulement des mono-infections mais, cette fois-ci, avec divers agents pathogènes tels que *P. multocida*, *H. somni*, BPI3 et BRSV.

Concernant les co-infections, 37,5% de vaches en lactation (3 VL sur 8), 12,5% de vaches tarées (1 VT sur 8) et 4 veaux sur 8 (50%) ont une co-infection avec deux agents pathogènes au début de l'année.

À la fin de l'année, les 3 génisses restantes (100%), 2 vaches en tarissement sur 6 (33%) et 2 veaux sur 8 (25%) possèdent une co-infection avec deux agents pathogènes.

Pour finir, seulement un veau et une vache en tarissement révèlent une co-infection avec trois agents pathogènes : *P. multocida* / *H. somni* / BPI3 pour le veau et *P. multocida* / *H. somni* / BRSV pour la vache tarie.

		Année 2													
E1		J0 (11/10/2022)							J280 (17/07/2023)						
		IDV	BCoV	BRSV	BPI3	M. bovis	P. multocida	H. somni	IDV	BCoV	BRSV	BPI3	M. bovis	P. multocida	H. somni
Vaches en Lactation	1						34,76					22,06			
	2						25,52	32,4							
	3						31,87	30,91							
	4						20,7	28,72						23,79	
	5						34,77							36,14	
	6						32,62								30,91
	7						31,98								26,47
	8							27,03				20,82			
Génisses (veaux de l'année 1)	9						29,61								
	10						22,5				17			24,36	
	11						32,3								
	12						31,78								
	13						29,88							29,21	28,81
	14						32,09								
	15						26,72							21,8	28,36
	16						21,73								
Vaches Tarées	17						33,56							34,53	35,69
	18						29,82							32,83	
	19						32,41								
	20				23,59		30,64								
	21						29,7							24,87	
	22						34,14							21,5	
	23						30,32				22,07			37,41	36,68
	24						27,75				17,02			37,47	
Nouveaux veaux	25						19,15					27,15		24,66	27,69
	26						24,29	35,69						24,19	
	27						22,72							34,04	
	28						22,42	36,68						24,43	
	29						22,27							25,4	
	30						19,48				22,34			25,5	
	31						21,01							32,06	22,7
	32						20,4							27,35	

Code couleur valeur Ct	
35-40	
30-35	
25-30	
20-25	
15-20	

Tableau 9 : Résultat q-PCR (en Ct) des EN dans l'exploitation E1 année 2

Le tableau 7 indique les résultats obtenus lors des q-PCR de l'exploitation E2.

Lors des prélèvements à J0, 13 bovins sur les 32 prélevés (40,63%) révèlent une mono-infection, 12 individus (37,5%) présentent une co-infection avec deux agents pathogènes et pour finir 2 bovins sur 32 (6,26%) possèdent une co-infection avec trois ou quatre agents pathogènes.

En début d'année, nous constatons que 100% des veaux présentent une co-infection avec au moins deux agents pathogènes. 75% des veaux sont positifs à deux agents pathogènes et 25% ont une co-infection avec trois ou quatre agents pathogènes.

Concernant les génisses et les vaches tarées, 100% des deux échantillons possèdent une mono-infection. Pour les vaches tarées *P. multocida* est seulement présent ; pour les génisses, la grande majorité du lot est positif à *P. multocida* avec 87,5% (7 génisses sur 8) et une seule génisse prélevée est positive à *H. somni*.

Pour les vaches en lactation, 50% (4 VL sur 8) du lot ont montré une co-infection avec deux agents pathogènes et pour 75% (3 VL sur 4) de ces co-infections, l'agent pathogène présent est soit *P. multocida* soit *H. somni*.

P. multocida a été identifié pour 25% des bovins en lactation ayant une mono-infection.

Le second prélèvement réalisé dans cette exploitation (à 60 jours), met en évidence, une majorité de mono-infection à *P. multocida* pour les lots sélectionnés antérieurement, et une association d'agents pathogènes pour les 7 veaux prélevés en plus (veaux malades constatés par l'éleveur).

À J60, nous avons 100% des vaches en lactation, 100% des vaches en tarissement, 83% (5 génisses sur 6) et 100% des veaux du premier lot possédant une mono-infection avec une grande majorité positifs à *P. multocida* et quelques positifs à *H. somni*.

Concernant les nouveaux veaux, 2 veaux sur 7 (28,5%) ont révélé une mono-infection à *P. multocida*, 2 sur 7 (28,5%) ont montré une co-infection avec deux agents pathogènes *P. multocida* / *M. bovis*. Et 3 veaux sur 7 (42,9%) une co-infection avec trois agents pathogènes *P. multocida* / *M. bovis* / BCoV.

Pour les derniers prélèvements de l'année, 100% des vaches en lactation ont indiqué une mono-infection dont 75% positifs à *P. multocida* et 25% positifs à *H. somni*.

Pour les génisses, 83% (5 génisses sur 6) ont une mono-infection à *P. multocida* et une génisse s'est révélée positive à une co-infection entre *P. multocida* et *H. somni*.

Concernant les veaux des derniers prélèvements, nous comptons les veaux initialement sélectionnés avec les veaux sélectionnés à J60.

8 veaux sur 11 (72,7%) présentent une mono-infection à *P. multocida* et les 3 veaux restant (27,3%) possèdent une co-infection à deux pathogènes. Dans les co-infections chez les veaux, 2 sur 3 (66%) ont une co-infection *P. multocida* / *H. somni* et 1 sur 3 (33%) a une co-infection *P. multocida* / *M. bovis*.

E2	Année 1																				
	J0 (15/12/2021)						J60 (22/12/2022)						J370 (12/02/2022)								
	IDV	BCoV	BRSV	BPI3	M. bovis	P. multocida	H. somni	IDV	BCoV	BRSV	BPI3	M. bovis	P. multocida	H. somni	IDV	BCoV	BRSV	BPI3	M. bovis	P. multocida	H. somni
Vaches en lactation	1					35,99															
	2					33,58	32,92	33,8													
	3																				
	4																				
	5						35,69							31,10							27,91
	6						36,68							35,04							26,21
	7					30,51		28,34						34,4							
	8					31,10		33,6													36,4
Génisses	9					35,04							29,04							32,23	32,51
	10					34,4							34,21							34,21	
	11					35,79							34,03	28,34						36,08	
	12					29,04								33,6						26,53	
	13					35,16							35,24								28,7
	14					34,03		34,11													32,48
	15					35,24								35,32							
	16																				
Vaches Tarées	17					33,98								27,91							
	18					35,61															
	19																				
	20																				
	21																				
	22					33,15								29,88							
	23					35,7															
	24																				
Veaux	25				26,21	25,33							32,09							33,6	32,66
	26	22,35			32,51	32,39	32,66						26,72							33,36	
	27	29,89			26,20	31,85							24,73								
	28				34,82	34,54								32,76						33,6	33,19
	29				31,53		33,19														
	30				30,76	27,2								32,56							34,94
	31				29,98	26,59								33,19							33,77
	32				27,14	24,43															35,9
Veaux malades	1							32,48				33,06	32,69								
	2							31,27				31,80	34,96								25,71
	3											29,86	29,42								26,2
	4											34,03	29,92								
	5												29,13								33,79
	6												31,12								32,6
	7								30,81				29,27	31,42						29,35	27,54

Tableau 10 : Résultat q-PCR (en Ct) des EN dans l'exploitation E2

Code couleur valeur Ct			
35-40		20-25	
30-35		15-20	
25-30			

Pour terminer, le tableau 8 indique les résultats obtenus pour l'exploitation E3.

Lors des prélèvements à J0, 19 bovins sur les 32 prélevés (59,3%) ont une mono-infection et 8 bovins (25%) comptent une co-infection avec deux agents pathogènes. Pour les prélèvements à J280, 18 bovins sur les 30 prélevés (60%) présentent une mono-infection, 26,6% (8 bovins sur 30) ont une co-infection avec deux agents pathogènes et 2 bovins sur 30 (6%) une co-infection avec trois agents pathogènes.

Pour les premiers prélèvements, nous remarquons que 57% (soit 4 VL sur 7) ont une mono-infection à *P. multocida* et 42% (soit 3 VL sur 7) une co-infection avec *P. multocida* / *H. somni*.

Pour les vaches en tarissement, 75% (3 VT sur 4) révèlent une mono-infection et 25% (soit une vache) une co-infection *P. multocida* / *M. bovis*.

Pour les génisses et les veaux, on obtient les mêmes résultats avec 75% de mono-infection à *P. multocida* et 25% de co-infection à deux pathogènes. Pour les génisses, il y a la même co-infection, c'est-à-dire *P. multocida* / *H. somni* ; alors que pour les veaux, il y a un veau qui présente une co-infection *P. multocida* / *H. somni* et un *P. multocida* / BCoV.

Pour les prélèvements à J280, nous constatons que 50% (3 VL sur 6) des vaches en lactation ont une mono-infection à *P. multocida*. 33% (2 VL sur 6) ont une mono-infection à *P. multocida* / *H. somni*. Et une vache en lactation sur les 6 une co-infection a trois agents pathogènes *P. multocida* / *M. bovis* / BRSV.

Pour les vaches en tarissement, 66% (4 VT sur 6) ont une mono-infection dont 75% à *P. multocida* et 25% à *H. somni*. 33% une co-infection à *P. multocida* / *H. somni*.

Pour les génisses, 75% (6 génisses sur 8) présentent une mono-infection à *P. multocida* et 25% une co-infection entre *P. multocida* / BRSV.

Concernant les veaux, 62,5% (5 veaux sur 8) ont une mono-infection dont 80% à *P. multocida*. Un veau présente une mono-infection au virus BRSV. 37,5% (3 veaux sur 8) possèdent une co-infection à *P. multocida* et *H. somni*. Pour finir, un veau révèle une co-infection à trois agents pathogènes *P. multocida* / *H. somni* / BCoV.

E3		Année 2													
		J0 (11/10/2022)						J280 (18/07/2023)							
		IDV	BCoV	BRSV	BPI3	<i>M. bovis</i>	<i>P. multocida</i>	<i>H. somni</i>	IDV	BCoV	BRSV	BPI3	<i>M. bovis</i>	<i>P. multocida</i>	<i>H. somni</i>
Vaches en Lactation	1						27,52							35,69	
	2						23,44							33,27	33,57
	3						21,08							36,48	27,08
	4						20,9	27,82							
	5						31,89	38,3						27,44	
	6						34,22	25,19						27,78	
	7														
	8						25,4				23,35			35	32,83
Génisses	9						30,64	31,31						36,83	
	10						27,63	32,01						21,83	
	11						31,22							35,13	
	12						28,8							34,94	
	13						24,92							34,88	
	14						34,81							35,11	
	15						29,8				28			19,85	
	16						24,3				24,47			33,75	
Vaches Tarées	17						32,9							29,55	32,44
	18													32,38	39,66
	19														
	20														
	21						31,1							36,71	
	22						21,81							36,2	
	23													31,56	
	24					36,4	33,61								32,55
Veaux	25						32,07							18,41	20,54
	26		22,98				33,38							31,07	
	27						22,26							28,83	33,66
	28						20,28							23,96	21,99
	29						21,16							34,11	
	30						27,49			35,68				26,54	
	31						22,24							26,33	
	32						20,43	22,66							

Code couleur	valeur Ct
35-40	
30-35	
25-30	
20-25	
15-20	

Tableau 11 : Résultat q-PCR (en Ct) des EN dans l'exploitation E3

Annexe 3 : Résultats des tests d'inhibition de l'hémagglutination pour les souches D/5920 pour toutes les exploitations

Année 1				Année 2			
J0 14/12/2021		J150 04/06/2022		J0 11/10/2022		J280 17/07/2023	
7040	<10	7040	<10	9714	80	9714	40
8695	<10	8695	<10	8793	80	8793	S
8740	<10	8740	<10	8740	80	8740	10
9716	<10	9716	<10	9716	80	9716	20
8755	10	8755	<10	9700	<10	9700	<10
9614	<10	9614	<10	9613	<10	9613	<10
9682	<10	9682	<10	9631	80	9631	20
9700	<10	9700	<10	7139	40	7139	<10
1680	10	1680	<10	1693	80	1693	S
1681	<10	1681	<10	1694	80	1694	20
1682	<10	1682	<10	1695	40	1695	S
1683	<10	1683	<10	1696	80	1696	S
1684	<10	1684	<10	1697	40	1697	<10
1685	<10	1685	<10	1698	40	1698	S
1686	<10	1686	<10	1700	160	1700	40
1687	<10	1687	<10	1701	20	1701	S
185	<10	185	<10	7040	40	7040	20
7098	<10	7098	<10	8755	40	8755	20
7118	<10	7118	S	9618	80	9618	20
8483	<10	8483	<10	8792	80	8792	S
8756	<10	8756	<10	2349	40	2349	<10
9370	<10	9370	<10	1680	20	1680	<10
9711	<10	9711	S	1681	<10	1681	<10
9714	10	9714	<10	1682	80	1682	20
1693	<10	1693	<10	2935	<10	2935	<10
1694	<10	1694	<10	2936	10	2936	<10
1695	<10	1695	<10	2937	<10	2937	<10
1696	<10	1696	<10	2939	<10	2939	<10
1697	<10	1697	<10	2940	<10	2940	<10
1698	<10	1698	<10	2941	20	2941	<10
1700	10	1700	<10	2944	<10	2944	<10
1701	<10	1701	<10	2947	10	2947	<10

<10	
10	
20	
40	
80	
160	

J0		J60		J370	
15/12/2021		12/02/2023		22/12/2022	
4182	10	4182	10	4182	20
7632	<10	7632	S	7632	S
4193	20	4193	10	4193	80
9938	<10	9938	<10	9938	20
9939	<10	9939	<10	9939	40
7625	<10	7625	<10	7625	<10
9864	<10	9864	<10	9864	<10
1641	<10	1641	<10	1641	10
8212	<10	8212	<10	8212	<10
8210	<10	8210	<10	8210	<10
8209	<10	8209	<10	8209	<10
8231	10	8231	<10	8231	20
8164	10	8164	<10	8164	40
8265	20	8265	10	8265	<10
8256	<10	8256	<10	8256	<10
8255	20	8255	10	8255	<10
6776	<10	6776	S	6776	S
4144	<10	4144	<10	4144	20
1524	<10	1524	S	1524	S
1551	<10	1551	S	1551	S
4093	10	4093	10	4093	20
4110	<10	4110	<10	4110	10
1480	10	1480	<10	1480	<10
1544	<10	1544	<10	1544	80
7810	<10	7810	<10	7810	10
7822	<10	7822	<10	7822	<10
8282	<10	8282	<10	8282	<10
7806	<10	7806	<10	7806	<10
7812	<10	7812	<10	7812	<10
8258	<10	8258	<10	8258	10
8257	<10	8257	<10	8257	<10
8276	<10	8276	<10	8276	<10
7826	<10	7826	<10	7826	S
7807	<10	7807	<10	7807	10
7832	<10	7832	<10	7832	<10
7838	<10	7838	<10	7838	S
7833	<10	7833	<10	7833	<10
7837	<10	7837	<10	7837	<10
7835	<10	7835	<10	7835	<10

E3			
J0		J280	
11/10/2022		18/07/2023	
7533	80	7533	80
9145	20	9145	<10
716	40	716	40
9150	40	9150	40
9149	<10	9149	<10
756	40	756	40
724	80	724	80
9177	40	9177	80
1839	40	1839	40
1858	80	1858	80
1857	40	1857	40
2003	40	2003	40
2006	40	2006	40
1829	20	1829	40
1834	40	1834	80
1853	80	1853	<10
714	20	714	20
745	10	745	<10
764	20	764	S
7548	40	7548	S
8144	40	8144	80
754	20	754	40
773	40	773	<10
739	40	739	80
2040	10	2040	<10
2046	20	2046	<10
2039	<10	2039	<10
2045	40	2045	<10
2027	<10	2027	<10
2024	<10	2024	<10
2031	<10	2031	20
2033	<10	2033	<10

Circulation du virus influenza D en élevage laitier : suivi longitudinal dans trois exploitations

Nom et Prénom : RIVIERE Chloé

Résumé :

Les bronchopneumonies infectieuses (BPI) sont des pathologies multifactorielles qui représentent des enjeux sanitaires et économiques très importants dans les exploitations bovines. L'objectif de cette thèse était d'étudier en élevage laitier la circulation d'un virus récemment identifié : le virus influenza D (IDV). Pour cela, 280 bovins, répartis en 4 catégories (veaux, génisses, vaches tarées et vaches en lactation) et provenant de 3 exploitations, ont été prélevés par prise de sang au début de l'automne et pendant l'été suivant pour la recherche d'anticorps anti-IDV. En parallèle, la recherche d'agents pathogènes respiratoires a été réalisée sur écouvillons nasaux aux mêmes dates et en cas de troubles respiratoires dans l'élevage. Les résultats sérologiques suggèrent que le virus IDV circule facilement dans les élevages testés mais de manière asymptomatique ou avec des signes cliniques respiratoires modérés.

Mots-clés : Bronchopneumonie Infectieuse, bovins, exploitation laitière, Delta Influenzavirus, IDV, sérologie

Circulation of influenza D virus in dairy cattle: longitudinal follow-up in three farms

Summary:

Bovine respiratory disease (BRD) is a multifactorial disease which represent very important health and economic issues in cattle farms. The aim of this study was to examine the circulation of a recently identified respiratory virus on dairy farms: The Influenza D virus (IDV). Thus, 280 cattle in 4 categories (calves, heifers, dry cows and lactating cows) from 3 farms were sampled for IDV antibodies in early autumn and the following summer. Nasal swabs were tested for respiratory pathogens on the same dates and in the event of respiratory disorders on the farm. Results suggest that IDV circulates easily in dairy farms, but asymptotically or with moderate clinical respiratory signs.

Keywords: Bovine respiratory disease, bovine, dairy cows, Delta Influenzavirus, IDV, serology