



**HAL**  
open science

# Implication des entérovirus bovins dans les diarrhées du veau : étude d'échantillons par séquençage nouvelle génération

Alexandre Feval

► **To cite this version:**

Alexandre Feval. Implication des entérovirus bovins dans les diarrhées du veau : étude d'échantillons par séquençage nouvelle génération. Médecine vétérinaire et santé animale. 2021. dumas-04771872

**HAL Id: dumas-04771872**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04771872v1>**

Submitted on 7 Nov 2024

**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.

Copyright

Année 2021

**IMPLICATION DES ENTÉROVIRUS BOVINS DANS LES  
DIARRHÉES DU VEAU : ÉTUDE D'ÉCHANTILLONS PAR  
SÉQUENÇAGE NOUVELLE GÉNÉRATION**

**THÈSE**

pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant  
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL  
le 15 avril 2021

par

**Alexandre FEVAL**

sous la direction de

**Yves MILLEMANN**

et avec la participation en tant qu'invité de

**Philippe GIRAUD**

<b>Président du jury :</b>	<b>M. Jean-Philippe BASTARD</b>	Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL
<b>1<sup>er</sup> Assesseur :</b>	<b>M. Yves MILLEMANN</b>	Professeur à l'EnvA
<b>2<sup>nd</sup> Assesseur :</b>	<b>Mme. Sophie LE PODER</b>	Professeur à l'EnvA



# Liste des personnes intervenant dans l'enseignement



Directeur : Pr Christophe Degueurce  
 Directeur des formations : Pr Henry Chateau  
 Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Professeurs émérites : Pr Pascal Fayolle, Pr Bernard Paragon  
 Directeurs honoraires : MM. Les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

## Département d'Élevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

<p><b>Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</b> - Pr Verwaerde Patrick</p> <p><b>Discipline : cardiologie</b> - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier contractuel</p> <p><b>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</b> - Dr Pignon Charly, Ingénieur de recherche - Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p><b>Discipline : dermatologie</b> - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p><b>Discipline : ophtalmologie</b> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences</p> <p><b>Unité pédagogique de clinique équine</b> - Pr Audigié Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Coudry Virginie, Praticienne hospitalier contractuelle - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Ingénieure de recherche-Praticienne hospitalier - Dr Moiroud Claire, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tallaj Amélie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel</p>	<p><b>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</b> - Dr Benckroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane*</p> <p>- Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Maurey-Guénec Christelle, Maître de conférences - Dr Mortier Jérémy, Maître de conférences associé</p> <p><b>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</b> - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Fontbonne Alain - Pr Grandjean Dominique*</p> <p>- Dr Maenhoudt Cindy, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Nueldmann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p><b>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</b> - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Manassero Mathieu - Dr Maurice Emeline, Assistante d'Enseignement et de Recherche Contractuelle - Pr Viateau-Duval Véronique*</p>
---	--

## Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

<p><b>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</b> - Dr Bolnot François, Maître de conférences* - Pr Cartier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mtmet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle</p> <p><b>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie</b> - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara*</p> <p>- Dr Guétin Poirier Valentine, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences</p> <p><b>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</b> - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier contractuel - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences</p>	<p><b>Unité pédagogique de reproduction animale</b> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences</p> <p><b>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</b> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences* - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew</p> <p><b>Rattachée DPASP</b> - Dr Wolgust Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle</p>
--	---

## Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - Adjoint : Pr Pilot-Storck Fanny

<p><b>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</b> - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline*</p> <p><b>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</b> - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences*</p> <p><b>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</b> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences</p> <p><b>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</b> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Jouvion Grégory, Professeur associé - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences*</p> <p><b>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</b> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Épidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Marnigac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée</p>	<p><b>Unité de parasitologie, mycologie</b> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Pr Guillot Jacques - Dr Polack Bruno, Maître de conférences* - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences</p> <p><b>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</b> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud</p> <p><b>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</b> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p><b>Rattachée DSBP</b> - Mme Dalaine Stéphanie, Professeur agrégée (Sciences de la Vie et de la Terre)</p>
--	---

\* responsable d'unité pédagogique



# Remerciements

**À M. Jean-Philippe BASTARD, Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Hommage respectueux.

**À M. Yves MILLEMANN, Professeur à l'EnvA,**

Pour votre patience à toute épreuve et votre grande disponibilité. Pour m'avoir fait confiance jusqu'au bout malgré le retard que j'ai pris dans l'achèvement de cette thèse.

Je vous remercie énormément.

**À Mme Sophie LE PODER, Professeur à l'EnvA,**

Pour avoir accepté d'être l'assesseur de cette thèse et pour avoir relu et corrigé ce manuscrit.

Sincères remerciements.

**À M. Philippe GIRAUD, Responsable du service virologie du laboratoire départemental d'analyses du Pas-de-Calais,**

Pour m'avoir permis de réaliser ce travail qui vous tenez tant à cœur et pour votre disponibilité lors de notre rencontre et de nos échanges.

Sincères remerciements.

**À mes parents, mes frères, ma sœur, ma famille et mes amis d'Alfort et d'ailleurs,**

Pour votre présence à mes côtés et votre soutien en toutes circonstances, pour tous les souvenirs passés et à venir. Je vous aime et vous embrasse.



# Table des matières

---

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux .....	7
Liste des abréviations.....	9
Glossaire.....	11
Introduction .....	13
Première partie : bibliographie.....	15
1. Etiologie des diarrhées du veau.....	15
1.1. Etiologie générale : Corrélation entre infection et âge du veau.....	15
1.2. Co-infections, postulats de Koch et critères de Hill .....	18
1.2.1. Postulats de Koch et critères de Hill .....	18
1.2.2. Co-infections prédominantes .....	20
1.3. Description des agents étiologiques chez les veaux âgés de plus d'un mois .....	21
1.3.1. Infections bactériennes.....	21
1.3.1.1. <i>Colibacillose</i> .....	21
1.3.1.2. <i>Salmonellose</i> .....	22
1.3.1.3. <i>Campylobacteriose</i> .....	23
1.3.1.4. <i>Clostridiose</i> .....	23
1.3.1.5. <i>Diagnostic des infections bactériennes</i> .....	25
1.3.2. Infections virales.....	26
1.3.2.1. <i>Coronavirus</i> .....	26
1.3.2.2. <i>Virus de la BVD</i> .....	26
1.3.2.3. <i>Autres virus</i> .....	27
1.3.2.4. <i>Diagnostic des infections virales</i> .....	28
1.3.3. Infections parasitaires.....	29
1.3.3.1. <i>Coccidiose</i> .....	29
1.3.3.2. <i>Giardiose</i> .....	30
1.3.3.3. <i>Nématodoses</i> .....	31
1.3.3.4. <i>Diagnostic des infections parasitaires</i> .....	32
1.3.4. Causes non-infectieuses .....	33
1.3.4.1. <i>Cause alimentaire</i> .....	33
1.3.4.2. <i>Syndrome du buveur ruminal</i> .....	33
1.3.4.3. <i>Cause iatrogène</i> .....	34
2. Entérovirus bovins .....	36
2.1. Présentation .....	36
2.1.1. Taxonomie .....	36
2.1.1.1. <i>Famille des Picornaviridae</i> .....	36
2.1.1.2. <i>Le genre Enterovirus</i> .....	39
2.1.2. Les entérovirus bovins .....	43
2.1.2.1. <i>Description</i> .....	43
2.1.2.2. <i>Structure</i> .....	44
2.1.2.2.1. <i>Morphologie</i> .....	44
2.1.2.2.2. <i>Structure génétique</i> .....	46
2.1.2.3. <i>Propriétés physico-chimiques</i> .....	48
2.1.3. Présentation des entérovirus bovins : bilan .....	49
2.2. Physiopathologie .....	50
2.2.1. Généralités et voies de contamination .....	50
2.2.2. Cycle viral .....	50
2.2.3. Excrétion virale .....	53
2.2.4. Immunité .....	53



2.2.5.	Physiopathologie : bilan .....	53
2.3.	Épidémiologie et étude clinique.....	54
2.3.1.	Prévalence et présentation .....	54
2.3.2.	Signes cliniques.....	54
2.3.2.1.	Signes digestifs .....	54
2.3.2.2.	Signes respiratoires .....	55
2.3.2.3.	Troubles de la reproduction .....	55
2.3.2.4.	Autres manifestations cliniques.....	55
2.3.3.	Épidémiologie et étude clinique : bilan .....	55
2.4.	Diagnostic.....	56
2.4.1.	Diagnostic différentiel .....	56
2.4.2.	Prélèvements.....	56
2.4.3.	Méthodes diagnostiques directes.....	56
2.4.3.1.	Isolement viral.....	56
2.4.3.2.	RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).....	57
2.4.3.3.	Séquençage nouvelle génération.....	59
2.4.3.3.1.	Exemple de la technologie Illumina® .....	59
2.4.3.3.2.	Application aux entérovirus bovins.....	60
2.4.4.	Méthodes diagnostiques indirectes.....	60
2.4.4.1.	Séroneutralisation .....	60
2.4.4.2.	Hémagglutination passive et test de fixation du complément.....	61
2.4.4.3.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	61
2.4.5.	Diagnostic : bilan .....	63
2.5.	Prévention et traitement .....	64
2.5.1.	Mesures hygiéniques .....	64
2.5.2.	Vaccination .....	65
2.5.3.	Traitement.....	65
2.5.4.	Prévention et traitement : bilan .....	66
2.6.	Autres applications .....	67
2.6.1.	Vecteurs de vaccin .....	67
2.6.2.	Virus oncolytiques.....	68
2.6.3.	Autres applications : bilan.....	68
Deuxième partie: étude expérimentale .....		69
1.	Introduction .....	69
2.	Étude préalable .....	69
2.1.	Commémoratifs.....	70
2.2.	Tests réalisés avant le séquençage nouvelle génération.....	72
2.2.1.	Tests généraux d'exploration pour les étiologies les plus rencontrées.....	72
2.2.2.	Effet cytopathique.....	74
3.	Première phase : le criblage.....	75
3.1.	Préparation des échantillons .....	75
3.2.	Analyse bio-informatique .....	76
3.2.1.	Nettoyage.....	76
3.2.2.	Assemblage de novo .....	77
3.2.3.	Analyse des assemblages de séquences .....	77
3.2.4.	Analyse du bactériophage et de la bactérie.....	77
3.2.5.	Analyse des séquences d'entérovirus .....	78
3.3.	Conclusions de la première phase .....	80
4.	Deuxième phase : l'affinage .....	82
4.1.	Protocole .....	82
4.2.	Analyses et conclusions .....	84
4.2.1.	Régions 5'UTR et 3'UTR .....	84

4.2.2.	Polyprotéine .....	85
4.2.3.	Clusters E et F.....	87
4.2.3.1.	Cluster E.....	87
4.2.3.2.	Cluster F.....	87
4.2.4.	Examen de la structure cristallographique.....	88
5.	Discussion.....	90
5.1.	Étude préalable .....	90
5.1.1.	Choix des échantillons.....	90
5.1.2.	Tests réalisés préalablement au séquençage .....	91
5.2.	Phase de criblage.....	92
5.2.1.	Préparation des échantillons.....	92
5.2.2.	Analyse .....	93
5.3.	Affinage du séquençage.....	93
	Conclusion.....	95
	Liste des références bibliographiques .....	97



# Liste des figures

---

Figure 1 : Facteurs impliqués dans l'apparition de diarrhées chez les veaux (Belbis, 2017) .....	16
Figure 2 : Incidence relative des principaux agents pathogènes responsables de diarrhées chez des veaux de moins de 30 jours en fonction de leur âge (Belbis, 2017) .....	16
Figure 3 : Répartition des veaux sains et atteints de diarrhées en fonction du nombre d'agents pathogènes détectés dans leurs selles par technique de PCR (Cho <i>et al.</i> , 2013) .....	20
Figure 4 : Physiopathologie des <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) (Belbis, 2017) .....	22
Figure 5 : Aspect des selles hémorragiques chez un veau atteint de salmonellose (Peek <i>et al.</i> , 2018).....	23
Figure 6 : Ulcérations caractéristiques de la maladie des muqueuses (MD) chez une génisse IPI (Peek <i>et al.</i> , 2018).....	27
Figure 7 : Cycle des espèces du genre <i>Eimeria</i> (Blaga, 2016).....	30
Figure 8 : Présentation générale du cycle des nématodes gastrointestinaux chez les bovins (Adult worm : forme adulte de nématode ; egg : œuf de nématode) (Charlier <i>et al.</i> , 2020).....	31
Figure 9 : Liste actualisée des genres de la famille des <i>Picornaviridae</i> avec schéma de l'organisation génétique de chacun de ces genre (Zell <i>et al.</i> , 2017) .....	37
Figure 10 : Détail de la structure et de l'expression génétique du poliovirus 1 (Espèce : <i>Enterovirus C</i> , Genre : <i>Enterovirus</i> ) (Zell <i>et al.</i> , 2017) .....	38
Figure 11 : Détail de la structure et de l'expression génétique du virus de la fièvre aphteuse (Espèce : Foot-and-mouth disease virus, Genre : <i>Aphthovirus</i> ) (Zell <i>et al.</i> , 2017) .....	38
Figure 12 : Arbre phylogénétique présentant les différentes espèces d'entérovirus et de rhinovirus (Bessaud <i>et al.</i> , 2018).....	41
Figure 13 : Évolution de la nomenclature du genre <i>Enterovirus</i> depuis 2000 (Bessaud <i>et al.</i> , 2018) .....	42
Figure 14 : Structure simplifiée d'un entérovirus (a.) comparée à l'ultrastructure du virus PS-87 (EV-F3) obtenue par cristallographie par rayons lasers à électrons libres émettant des rayons X (b.) (Roedig <i>et al.</i> , 2017 ; Baggen <i>et al.</i> , 2018) .....	44
Figure 15 : Coupe de la structure simplifiée d'un entérovirus (Yi <i>et al.</i> , 2017) .....	45
Figure 16 : Représentation des différentes densités électroniques au sein d'une poche hydrophobe de l'entérovirus PS-87 (EV-F3) à l'aide de la cristallographie par rayons lasers à électrons libres émettant des rayons X (Roedig <i>et al.</i> , 2017).....	45
Figure 17 : Détail de la structure du génome des entérovirus et des protéines issues de l'expression de ce génome (Yi <i>et al.</i> , 2017) .....	47
Figure 18 : Structure détaillée de la région non-codante en 5' (5'UTR) dite en feuille de trèfle des entérovirus bovins (complexe IRES) (Hughes et Ryan, 2008) .....	47
Figure 19 : Insertion de la région codante additionnelle (uORF) sur le génome des entérovirus (Lulla <i>et al.</i> , 2019).....	47

Figure 20 : Représentation de la capside d'un virus de l'espèce <i>Enterovirus E</i> centrée sur un canyon : VP1 en bleu foncé, VP2 en bleu intermédiaire et VP3 en bleu clair (Goens <i>et al.</i> , 2004) .....	51
Figure 21 : Cycle viral schématisé d'un entérovirus dans une cellule humaine avec les détails du complexe de réplication (entre pointillés) (Baggen <i>et al.</i> , 2018).....	52
Figure 22 : Effet cytopathique (ECP) du virus HY12 (EV-E3) sur des lignées de cellules MDBK (Zhu <i>et al.</i> , 2014).....	57
Figure 23 : Étapes de la PCR (Gillier, 2013) .....	58
Figure 24 : Caractéristiques de la plateforme MiSeq utilisant la technologie Illumina® (Ilie <i>et al.</i> , 2014).....	59
Figure 25 : Principe du test ELISA par compétition pour le dosage d'anticorps (Lafont, 2021) .....	62
Figure 26 : Principe du test ELISA indirect en « sandwich » (Lafont, 2021).....	62
Figure 27 : Réponses immunitaires d'anticorps anti-E0 et anti-VP1 d'un entérovirus bovin constatées par immunofluorescence sur des cellules infectées par un virus recombinant entérovirus bovin – E0 (BEV-E0) (Ren <i>et al.</i> , 2020).....	67
Figure 28 : Effet cytopathique d'un entérovirus bovin sur des cellules d'adénocarcinome mammaire humain ; A : Cellules tumorales sans virus ; B : Cellules tumorales 16 h après l'inoculation du virus (Smyth <i>et al.</i> , 2002) .....	68
Figure 29 : Vue d'ensemble des lieux de prélèvements sur une carte simplifiée du Nord-Pas- de-Calais .....	71
Figure 30 : Mode opératoire pour la mise en évidence d'un ECP (D'après P. Giraud) .....	74
Figure 31 : Protocole d'extraction utilisé dans la deuxième phase de l'étude sur les 16 surnageants (D'après Biosellal) .....	82
Figure 32 : Alignement multiple des souches issues des surnageants en comparaison avec celles disponibles sur NCBI : vue détaillée de la région 5'UTR (D'après Biosellal) .....	84
Figure 33 : Alignement multiple des souches issues des surnageants en comparaison avec celles disponibles sur NCBI : vue détaillée de la région 3'UTR (D'après Biosellal) .....	85
Figure 34 : Arbre phylogénétique des entérovirus présents dans les échantillons et de séquences d'entérovirus de référence des espèces <i>Enterovirus E</i> et <i>Enterovirus F</i> issues du site NCBI (D'après Biosellal).....	86
Figure 35 : Détail de la région d'insertion de O43658 (N° Biosellal 1600015) (D'après Biosellal) .....	88
Figure 36 : Représentation schématisée de la demi-capside de BEV-1 (en bleu) et de la région N-terminale de VP1 (en rouge) : vue en coupe (D'après Biosellal) .....	89
Figure 37 : Représentation schématisée de la demi-capside de BEV-1 (en bleu) et de la région N-terminale de VP1 (en rouge) : vue générale (D'après Biosellal).....	89

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Étiologie générale des diarrhées chez le veau âgé de plus ou moins un mois ( - : absent ; +/- très peu rencontré ; + : rencontré régulièrement ; ++ : souvent rencontré ; +++ : dominante pathologique dans la tranche d'âge considérée)(Cho <i>et al.</i> , 2013 ; Cho et Yoon, 2014 ; Francoz <i>et al.</i> , 2017 ; Peek <i>et al.</i> , 2018) .....	17
Tableau 2 : Déclinement des postulats initiaux de Koch et des critères de Bradford Hill (Asokan et Asokan, 2016 ; Jindal, 2018) .....	19
Tableau 3 : Toxinotypes de <i>Clostridium perfringens</i> et leurs toxines associées (+ : libérée ; - : non libérée ; +/- : inconstant ; en rouge : toxinotypes touchant les bovins) (Rood <i>et al.</i> , 2018) .....	24
Tableau 4 : Prélèvements et tests réalisés lors de recherche de causes bactériennes de diarrhées chez les jeunes bovins (Francoz <i>et al.</i> , 2017) .....	25
Tableau 5 : Caractéristiques d'autres virus identifiés dans des cas de diarrhée chez de jeunes bovins (Gomez et Weese, 2017) .....	28
Tableau 6 : Présentation des nématodes les plus rencontrés chez les bovins en zone tempérée (Craig, 2018 ; Charlier <i>et al.</i> , 2020) .....	32
Tableau 7 : Causes principales d'apparition du syndrome du buveur ruminal (Francoz <i>et al.</i> , 2017) .....	34
Tableau 8 : Nomenclature, composition actuelle et spectre d'hôte des différentes espèces du genre <i>Enterovirus</i> (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2020) .....	40
Tableau 9 : Présentation des sérotypes connus des deux espèces d'entérovirus bovins associés à leur virus de référence (ICTV, 2020) .....	43
Tableau 10 : Propriétés du virus HY12, entérovirus bovin du sérotype EV-E3 en fonction des variations du milieu (Zhu <i>et al.</i> , 2014) .....	48
Tableau 11 : Comparaison des pourcentages de détection de quatre virus bovins dont les entérovirus bovins chez deux lot de veaux de classe d'âge différente avant et après l'amélioration des mesures d'hygiène au sein d'un élevage japonais (Takahashi <i>et al.</i> , 2020) .....	64
Tableau 12 : Comparaison des pourcentages de détection de quatre virus bovins dont les entérovirus bovins chez 960 veaux en fonction des saisons (Takahashi <i>et al.</i> , 2020) .....	64
Tableau 13 : Commémoratifs des seize cas de l'étude (D'après P. Giraud) .....	70
Tableau 14 : Tests réalisés sur les seize prélèvements par le service du D <sup>r</sup> Giraud .....	73
Tableau 15 : Répartition des séquences entérovirus/ <i>Pseudomonas</i> / bactériophage en fonction des 16 surnageants (D'après Biosellal) .....	78
Tableau 16 : Tableau comparatif entre fréquences des séquences, nombre de passages, type de prélèvement et commémoratifs pour chaque surnageant (D'après Biosellal) .....	79
Tableau 17 : Répartition des séquences brutes entérovirus / <i>Pseudomonas</i> / bactériophage en fonction des différents protocoles d'extraction (D'après Biosellal) .....	81
Tableau 18 : Répartition des séquences nettoyées entérovirus / <i>Pseudomonas</i> / bactériophage en fonction des différents protocoles d'extraction (D'après Biosellal) .....	81

Tableau 19 : Couvertures moyennes et taille des assemblages de séquences obtenues pour les 16 entérovirus retrouvés et comparaison avec d'autres souches d'entérovirus (D'après Biosella).....	83
Tableau 20 : Matrice d'homologie des entérovirus présents dans les échantillons et de séquences d'entérovirus de référence des espèces <i>Enterovirus E</i> et <i>Enterovirus F</i> issues du site NCBI (D'après Biosella) .....	86
Tableau 21 : Synthèse corrélant âge et nature des troubles observés.....	90
Tableau 22 : Agents pathogènes retrouvés et corrélation avec les signes cliniques observés dans les 16 échantillons (détail des 13 cas de troubles digestifs uniquement) .....	92

# Liste des abréviations

---

**3'UTR** : « 3' *Untranslated Transcribed Region* » = région non-codante en 3'

**5'UTR** : « 5' *Untranslated Transcribed Region* » = région non-codante en 5'

**Ac** : Anticorps

**Ag** : Antigène

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADNc** : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

**ARN** : Acide RiboNucléique

**AS** : Axe de Symétrie

**BEV** : « Bovine Enterovirus » = entérovirus bovin

**BoHV-1** : Herpèsvirus Bovin de type 1

**BoHV-4** : Herpèsvirus Bovin de type 4

**BVD** : « Bovine Viral Diarrhoea » = Diarrhée virale bovine

**CPE** : « *Clostridium Perfringens Enterotoxin* » = entérotoxine de *Clostridium perfringens*

**CS31A** : Souche ETEC d'*Escherichia coli*

**DNAses** : DésoxyriboNucléAses

**dT** : désoxyThymidine

**E0** : Glycoprotéine d'enveloppe du virus de la BVD

**EAEC** : « *Enteroggregative Escherichia Coli* » = *Escherichia coli* attachants effaçants

**ECP** : Effet CytoPathique

**EHEC** : « *Enterohaemorrhagic Escherichia Coli* » = *Escherichia coli* entérohémorragiques

**ELISA** : « *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* » = essai d'immuno-absorption enzymatique

**EPEC** : « *Enteropathogenic Escherichia Coli* » = *Escherichia coli* entéro-pathogènes

**ERAV** : « *Equine Rhinovirus A Virus* » = rhinovirus équin de type A

**ERBV** : « *Equine Rhinovirus B Virus* » = rhinovirus équin de type B

**ETEC** : « *Enterotoxigenic Escherichia Coli* » = *Escherichia coli* entérotoxinogènes

**EV-** : Préfixe pour « *Enterovirus* »

**FMDV** : « *Foot-and-Mouth Disease Virus* » = virus de la fièvre aphteuse

**FY** : Souche ETEC d'*Escherichia coli* nommée dorénavant F17

**IBR** : « *Infectious Bovine Rhinotracheitis* » = rhinotrachéite infectieuse bovine

**ICTV** : « *International Committee on Taxonomy of Viruses* »

**IPI** : Infecté Persistant Immunotolérant

**IRES** : « *Internal Ribosome Entry Site* »

**MD** : « *Mucosal Disease* » = maladie des muqueuses

**MDBK** : « *Madin-Darby Bovine Kidney* »



**mL** : millilitre

**NAHMS** : « *National Animal Health Monitoring System* »

**NCBI** : « *National Center for Biotechnology Information* »

**NetB** : « *Necrotic enteritis toxin B* »

**NGS** : « *Next-Generation Sequencing* » = séquençage nouvelle génération

**nm** : nanomètre

**nt** : nucléotide

**ORF** : « *Open Reading Frame* » = cadre de lecture ouvert

**PCR** : « *Polymerase Chain Reaction* » = réaction de polymérisation en chaîne

**Pi3** : virus Parainfluenza 3

**Poly-A** : PolyAdénylé

**RNAses** : RiboNucléAses

**RT** : « *Reverse Transcription* » = transcription inverse

**RT-PCR** : « *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* » = réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse

**RV-** : Préfixe pour « *Rhinovirus* »

**spp.** : « *species pluralis* » = toutes les espèces du genre considéré

**Stx 1 et 2** : Shigatoxines 1 et 2

**TCID<sub>50</sub>** : « *Fifty percent Tissue Culture Infective Dose* » = dose virale infectante pour 50 % des cellules en culture

**uORF** : « *upstream Open Reading Frame* » = cadre de lecture ouvert en amont

**UV** : UltraViolets

**VPg** : « *Viral Protein genome-linked* » = protéine virale liée au génome

**VRSB** : Virus respiratoire syncitial bovin

# Glossaire

---

**Acide rosmarinique** : composé phénolique de la famille des polyphénols retrouvés dans différentes plantes de la famille des *Lamiacées* ayant, en autres, des vertus antiinflammatoires, antibactériennes et antivirales.

**Amorce aléatoire** : courte séquence d'ARN ou d'ADN, complémentaire du début d'une matrice, composée d'oligonucléotides contenant au hasard chacune des quatre bases à chaque position et servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette matrice par une ADN polymérase.

**Assemblage de séquences (« contigs »)** : suite de séquences issues du séquençage nouvelle génération assemblées entre elles durant l'assemblage *de novo* en l'absence de toute référence connue.

**Couverture** : Quotient de la longueur totale des fragments séquencés appartenant à un génome donné par la longueur de ce génome ; Plus cette couverture est grande, plus la probabilité de séquencer la totalité du génome est grande.

**Criblage** : opération permettant une identification et un tri des séquences issues du séquençage nouvelle génération.

**Cycle monoxène** : cycle parasitaire ne nécessitant qu'un hôte, nommé hôte définitif, pour se réaliser complètement.

**Effet cytopathique** : ensemble des altérations métaboliques, biochimiques et morphologiques d'une cellule hôte infectée par un virus.

**Facteur de virulence** : molécule produite par un agent infectieux contribuant à son caractère pathogène en lui permettant par exemple d'échapper au système immunitaire de l'hôte ou encore de l'inhiber complètement.

**Matrice d'homologie** : Tableau permettant de comparer deux à deux plusieurs séquences en fonction des bases azotées issues du séquençage nouvelle génération.

**Organite de réplication** : Structure composée de lipides et de protéines issus d'une cellule hôte infectée par un virus qui permet de protéger l'étape de réplication virale en déjouant notamment le système immunitaire de l'hôte.

**Pathovar** : souche ou ensemble de souches de bactéries présentant des caractéristiques identiques ou similaires, différenciées par d'autres souches de la même espèce ou de la même sous-espèce sur la base de leur pouvoir pathogène.

**Période prépatente** : Temps qui sépare le moment où un animal est infesté par un parasite et celui où des œufs, larves, ou oocystes sont excrétés par le même animal.

**Séquençage nouvelle génération** : technique de séquençage génétique qui apportent des améliorations au processus initial de séquençage de Sanger en augmentant considérablement le nombre de séquençage réalisés en un temps donné.

**Séquence (« reads »)** : la définition officielle d'une séquence génétique est une suite de nucléotides. Le terme de séquence utilisé dans ce travail se réfère aux séquences issues du séquençage nouvelle génération.

**Sérovar ou sérotype** : catégorie dans laquelle certains virus ou certaines bactéries sont classés selon leur réaction en présence d'un sérum contenant des anticorps spécifiquement dirigés contre eux.

**SYBR Green I** : composé organique aromatique faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores) qui a la capacité de se lier aux acides nucléiques et d'émettre une fluorescence, ce qui en fait un agent fluorescent très intéressant notamment lors de la réalisation de PCR quantitatives.

**Toxinotype** : souche d'une bactérie libérant un ensemble spécifique de toxines la différenciant d'une autre souche de la même espèce.

# Introduction

---

Les syndromes diarrhéiques du veau représentent la première dominante pathologique en élevage et causent des pertes économiques majeures dans tous les pays du monde ; En 2007, aux Etats-Unis, les syndromes diarrhéiques ont été responsables de 57 % de la mortalité des veaux selon le NAHMS (« National Animal Health Monitoring System »). La perte économique est non seulement due à la mort du bovin mais aussi aux soins médicaux qui sont réalisés sur ceux-ci pour permettre leur rétablissement.

Il est donc primordial de savoir quels sont les agents rencontrés dans les cas de diarrhées chez le veau pour pouvoir traiter l'animal en conséquence mais aussi et surtout pour prévenir ces infections en utilisant notamment la vaccination. Les méthodes diagnostiques permettant d'identifier ces agents pathogènes ne cessent de se développer notamment par le biais du séquençage nouvelle génération qui tend à se standardiser.

Les entérovirus bovins, virus de la famille des *Picornaviridae*, sont des virus qui font justement partie de ces agents responsables de diarrhées chez le jeune bovin. Néanmoins ces virus sont très peu connus et très peu étudiés à ce jour, avec une physiopathologie chez les bovins qui n'a quasiment jamais été décrite dans la littérature.

L'objectif de ce travail est de donc de décrire l'étiologie des diarrhées chez le veau et plus particulièrement de faire une description détaillée des entérovirus bovins et de leur implication dans ces syndromes. Cette partie bibliographique sera suivie d'une partie expérimentale détaillant une étude de terrain menée par le laboratoire départemental du Pas-De-Calais conjointement avec le laboratoire Biosellal de Lyon dans laquelle des entérovirus bovins ont été identifiés par séquençage nouvelle génération chez 16 bovins souffrant pour la plupart de diarrhées chroniques mais aussi de problèmes respiratoires et de problèmes de reproduction pour quelques-uns d'entre eux.



# Première partie : bibliographie

---

## 1. Etiologie des diarrhées du veau

### 1.1. Etiologie générale : Corrélation entre infection et âge du veau

Un veau peut souffrir de diarrhées dès ses premiers jours de vie et jusqu'au sevrage voire même jusqu'à l'âge adulte. Les causes de ces diarrhées sont nombreuses ; Il s'agit d'une dominante pathologique incontournable que ce soit dans les élevages laitiers ou allaitants.

Ces différentes causes sont classées en deux grandes catégories : une catégorie majeure regroupant les diarrhées d'origine infectieuse et une catégorie regroupant les causes non - infectieuses, essentiellement d'origine alimentaire ; trois grands types d'agents pathogènes sont responsables de ces entérites : des bactéries, des virus et des parasites (Tableau 1).

Un très grand nombre de facteurs interviennent dans l'apparition de ces diarrhées ; en effet, certaines familles d'agents pathogènes sont identifiées chez des veaux n'ayant que quelques jours de vie en raison d'un déficit de transfert colostrale couplé à une pression infectieuse environnementale qui peut être élevée. D'autres pathogènes notamment les parasites ne sont retrouvés que plus tard dans la vie du veau en raison du fait que leurs cycles de développement nécessitent un certain temps pour se terminer : il s'agit de la période prépatente. (Figure 1 et 2) (Blaga, 2016 ; Belbis, 2017).

Figure 1 : Facteurs impliqués dans l'apparition de diarrhées chez les veaux (Belbis, 2017)

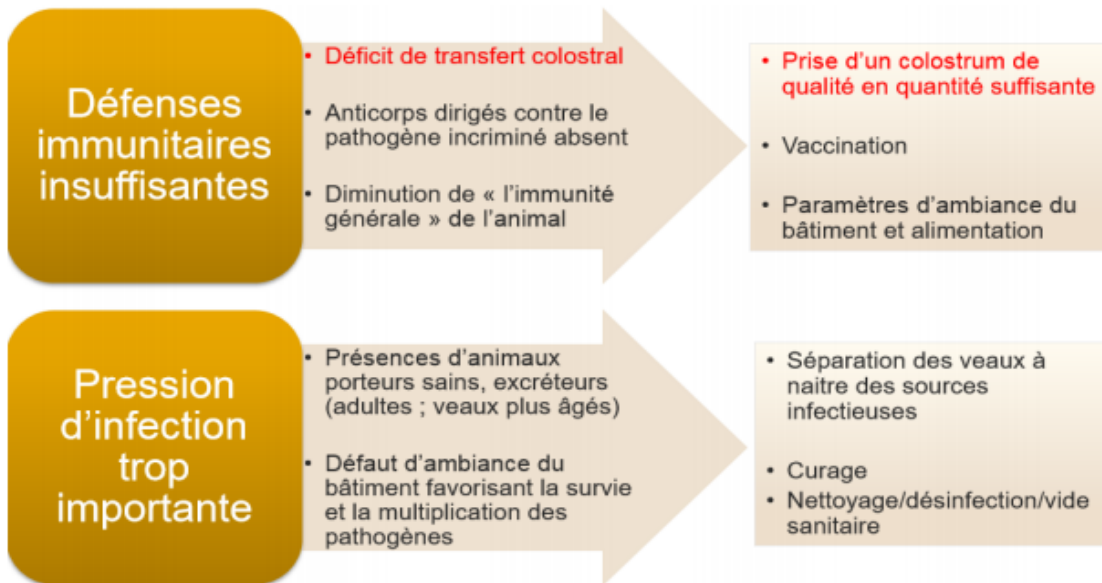
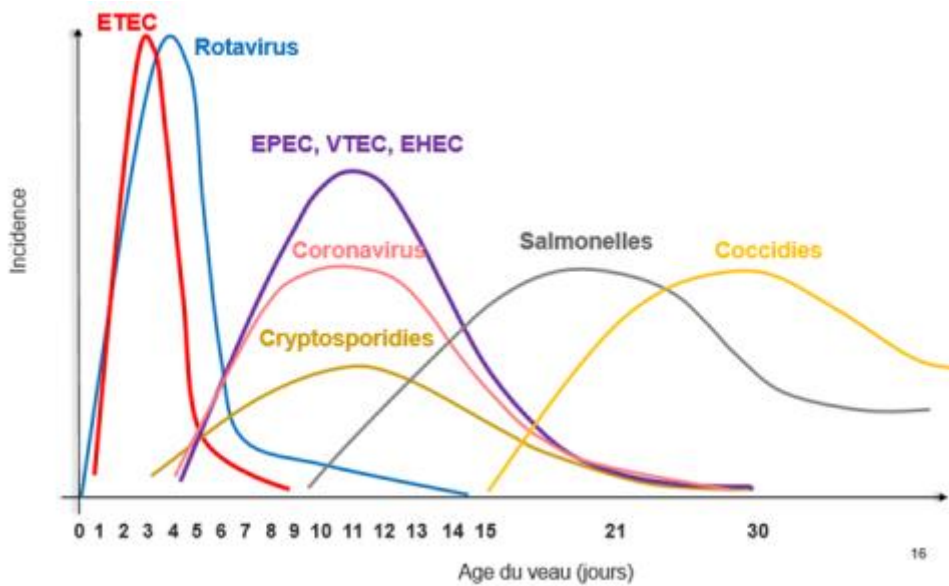


Figure 2 : Incidence relative des principaux agents pathogènes responsables de diarrhées chez des veaux de moins de 30 jours en fonction de leur âge (Belbis, 2017)



**Tableau 1 : Étiologie générale des diarrhées chez le veau âgé de plus ou moins un mois (- : absent ; +/- très peu rencontré ; + : rencontré régulièrement ; ++ : souvent rencontré ; +++ : dominante pathologique dans la tranche d'âge considérée)(Cho et al., 2013 ; Cho et Yoon, 2014 ; Francoz et al., 2017 ; Peek et al., 2018)**

Causes		Agents pathogènes rencontrés	Veau de moins d'un mois d'âge	Veau de plus d'un mois d'âge
Infectieuses	Bactéries	<i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (ETEC)	+++	-
		<i>Escherichia coli</i> attachants effaçants (EAEC)	++	+
		Salmonelles	++	+
		<i>Campylobacter</i> spp.	?	+
		<i>Clostridium perfringens</i>	+	+
		<i>Clostridioides difficile</i>	+	-
	Virus	Rotavirus	+++	-
		Coronavirus	+++	+
		Entérovirus	+/-	+
		Virus de la BVD	+	+
		Torovirus	+	+
		Aichivirus	+	+/-
		Norovirus	+	+/-
		Nebovirus	-	+
		Astrovirus	+	+/-
	Parasites	<i>Cryptosporidium parvum</i>	+++	-
		<i>Eimeria bovis</i> et <i>zuernii</i>	+/-	++
		<i>Giardia duodenalis</i>	+	+
		Nématodes gastro-intestinaux	<i>Strongyloïdes</i> spp.	++
Strongles			+/-	+++
	Ascarides	+/-	+	
Non-infectieuses	Alimentaire		+	+
	Iatrogène		+	+
	Buveur ruminal		+	+



## 1.2. Co-infections, postulats de Koch et critères de Hill

### 1.2.1. Postulats de Koch et critères de Hill

Les postulats de Koch sont un ensemble de critères permettant d'établir un lien de cause à effet direct entre la présence d'un agent pathogène et le développement d'une maladie (Tableau 2). Ils furent utilisés la première fois en 1884 dans le cas de la tuberculose causée par le « bacille de Koch ». Ces postulats n'ont cessé d'évoluer en particulier au cours du XXI<sup>e</sup> siècle avec des critères basés sur le développement de nouvelles techniques de séquençage de l'ADN comme le séquençage nouvelle génération. Ces postulats sont également constamment discutés, notamment dans le cas des virus séquencés grâce aux dernières techniques de laboratoire et ne pouvant pas être cultivés sur cellules, principe pourtant fondamentale des postulats initiaux de Koch : il s'agit des postulats métagénomiques de Koch (Mokili *et al.*, 2012).

L'application des postulats de Koch tels qu'ils sont définis est de plus en plus difficile : en effet, les techniques diagnostiques cliniques et histopathologiques ne cessent d'évoluer ce qui permet un séquençage complet d'un microbiome rendant l'incrimination d'un seul agent pathogène très difficile dans l'étiologie d'une maladie. De plus en plus de travaux sur des maladies émergentes sont effectués compliquant un peu plus l'application de ces postulats. Enfin, certaines infections bactériennes notamment celles impliquées dans les biofilms constituent une exception puisque la physiopathologie de ces bactéries se révèle complètement différente lorsqu'une infection dite « classique » est reproduite avec la même bactérie et leur croissance sur milieu enrichi peut se révéler presque nulle. À cela s'ajoute l'implication d'agents pathogènes dans des maladies non-infectieuses comme les cancers ou les cardiopathies par exemple (Hosainzadegan *et al.*, 2020).

En ce qui concerne les agents pathogènes responsables de diarrhées chez le veau, l'application de ces principes peut se révéler très facile notamment lors d'infections par des agents pathogènes très étudiés depuis des décennies comme les colibacilles ou *Cryptosporidium parvum* et dont la pathogénicité n'est plus à prouver ; néanmoins, ceci est beaucoup plus difficile pour des agents pathogènes méconnus, dont le pouvoir pathogène n'a pas été clairement identifié comme dans la plupart des viroses citées dans le tableau 1, en particulier les entérovirus bovins ou encore ceux dont la fréquence d'identification est très faible comme pour *Campylobacter* spp. L'application de ces postulats s'avère également être compliquée lorsque plusieurs agents sont rencontrés lors de séquençage global ou même de diagnostic de laboratoire plus classique : il s'agit de co-infections et ce schéma étiologique est de loin le plus répandu (Cho *et al.*, 2013).

Plus récemment, d'autres scientifiques se sont penchés sur la question de causalité entre un agent pathogène et une maladie : en 1965, Sir Bradford Hill définit ce que l'on appelle aujourd'hui les critères de Hill ou de Bradford Hill : il s'agit d'une liste de neuf critères (Tableau 2) permettant, s'ils sont majoritairement réunis, d'incriminer fortement une cause à un événement précis. Dans le cas de ce travail, il s'agirait donc d'incriminer un agent pathogène dans la survenue d'un syndrome diarrhéique chez un jeune bovin. Sir Bradford Hill lui-même estime que ces critères constituent un outil pour poser un diagnostic et qu'il ne s'agit en aucun cas d'un théorème qui implique nécessairement une causalité lorsque les critères sont réunis.

**Tableau 2 : Déclinement des postulats initiaux de Koch et des critères de Bradford Hill  
(Asokan et Asokan, 2016 ; Jindal, 2018)**

Postulats de Koch	Critères de Bradford Hill
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Le micro-organisme doit être présent en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais absent des organismes sains.</li> <li>➤ Ce micro-organisme doit pouvoir être isolé et croître en milieu de culture pur (ne contenant que ce seul microbe).</li> <li>➤ Le micro-organisme cultivé doit déclencher la même maladie chez un animal de laboratoire sensible.</li> <li>➤ Le micro-organisme doit être à nouveau isolé du nouvel organisme hôte rendu malade puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Force de l'association (plus l'ampleur des effets liés à l'association sont larges, plus un lien causal est probable, même si un faible effet n'implique pas une absence de lien de causalité)</li> <li>➤ Stabilité de l'association (sa répétition dans le temps et l'espace)</li> <li>➤ Cohérence (les mêmes observations sont réalisées dans différentes populations)</li> <li>➤ Spécificité (une cause produit un effet particulier dans une population particulière en l'absence d'autres explications)</li> <li>➤ Temporalité : les causes doivent précéder les conséquences</li> <li>➤ Relation dose-effet (une plus large dose mène à un plus large effet)</li> <li>➤ Plausibilité (plausibilité biologique, possibilité d'expliquer les mécanismes impliqués)</li> <li>➤ Preuve expérimentale (chez l'animal ou chez l'homme)</li> <li>➤ Analogie (possibilité d'explications alternatives)</li> </ul>

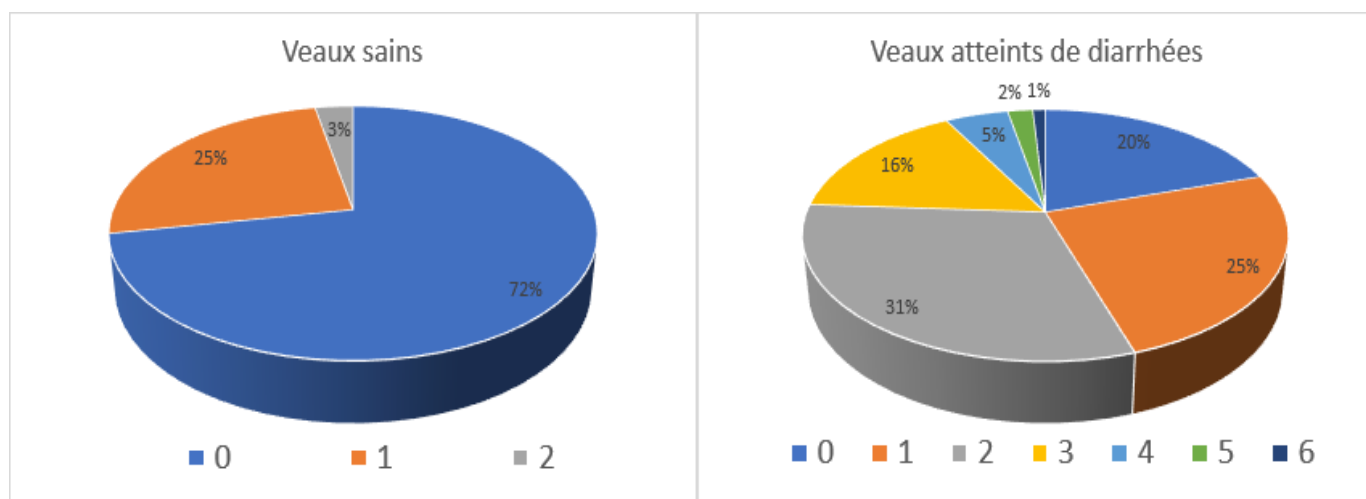
## 1.2.2. Co-infections prédominantes

Grâce au développement des techniques diagnostiques ces dernières années, il a été possible de montrer que les diarrhées néonatales étaient plus souvent causées par l'association de plusieurs agents pathogènes n'appartenant pas nécessairement à une même famille. Ces co-infections ont été prouvées chez d'autres espèces animales comme les espèces équinnes (Slovis *et al.*, 2014) et porcines (Shan *et al.*, 2011) mais aussi chez l'enfant dans les syndromes de gastro-entérites (Li *et al.*, 2016).

Cho *et al.* (2013) ont réussi à mettre en évidence ce principe de co-infection chez l'espèce bovine : ils ont étudié la présence de 11 agents pathogènes responsables de diarrhées chez le veau dans 199 et 245 prélèvements de selles provenant respectivement de veaux souffrant de diarrhées et de veaux cliniquement sains dans 165 cheptels différents (80 % de ces veaux avaient moins de trois mois d'âge). Ces agents sont des bactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp. et *Clostridium perfringens*), des virus (rotavirus, coronavirus, nebovirus, entérovirus, torovirus et norovirus bovins) et des parasites (*Cryptosporidium parvum*). Certains d'entre eux sont communément rencontrés dans ces syndromes diarrhéiques et d'autres sont plutôt émergents : les torovirus, les entérovirus, les norovirus et les nebovirus. La détection de ces agents pathogènes se fait par techniques de PCR. Il en résulte que plus de 50 % des veaux malades sont dans une situation de co-infection avec l'identification de plus cinq agents pathogènes chez 3 % d'entre eux. À l'inverse, aucun de ces 11 agents n'est détecté chez quasiment les trois quarts des veaux cliniquement sains même si un voire deux agents pathogènes ont été mis en évidence chez l'autre quart, malgré l'absence de signes cliniques (Figure 3). Cette étude montre également que l'infection la plus courante est composée de *Cryptosporidium parvum* associé au rotavirus bovins et que les agents pathogènes rencontrés chez les veaux cliniquement sains sont uniquement des virus, posant sérieusement la question de l'application des postulats de Koch à ces virus.

Une autre étude un peu plus antérieure avait montré un taux de co-infection d'environ 71 % sur environ 500 prélèvements de selles de veaux souffrant de diarrhées vis-à-vis des cinq agents les plus rencontrés : rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. et *Cryptosporidium parvum* (Izzo *et al.*, 2011).

**Figure 3 : Répartition des veaux sains et atteints de diarrhées en fonction du nombre d'agents pathogènes détectés dans leurs selles par technique de PCR (Cho *et al.*, 2013)**



## 1.3. Description des agents étiologiques chez les veaux âgés de plus d'un mois

### 1.3.1. Infections bactériennes

#### 1.3.1.1. Colibacillose

Les colibacilloses sont causées par une bactérie à coloration de Gram négative en forme de bâtonnet : *Escherichia coli*. Ces bactéries sont naturellement présentes dans le tractus digestif des bovins et la plupart d'entre elles ne sont pas pathogènes. Cependant certaines d'entre elles se révèlent pathogènes. L'ensemble de ces bactéries est classé en fonction de leur mécanisme d'action sur les cellules : ces catégories sont nommées pathovars.

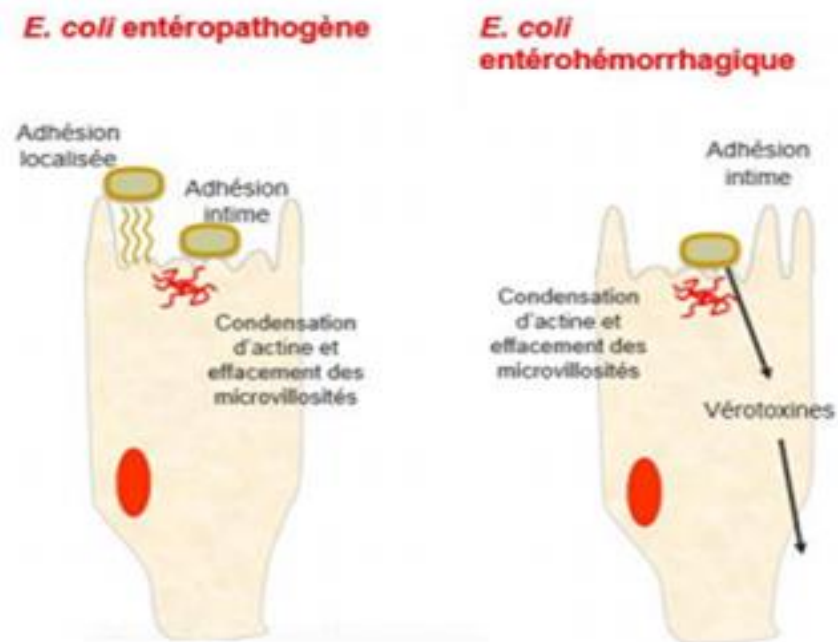
Les colibacilloses sont très répandues chez les veaux de moins d'un mois, en particulier les colibacilles entérotoxigènes ETEC (« *Enterotoxigenic Escherichia Coli* ») dans les 15 premiers jours de vie. Néanmoins certaines catégories de colibacilles peuvent être retrouvées chez des veaux plus âgés même si leur association avec les signes cliniques observés reste discutable (Holland *et al.*, 1999).

Les colibacilles impliqués dans les diarrhées chez des veaux de plus d'un mois font partie des colibacilles attachants effaçants EAEC (« *Enteropathogenic Escherichia Coli* »). Ce groupe regroupe les pathovars EPEC (« *Enteropathogenic Escherichia Coli* ») : colibacilles entérotoxigènes) et EHEC (« *Enterohaemorrhagic Escherichia Coli* ») (colibacilles entérohémorragiques) ; ils ont la particularité de se fixer à l'apex des villosités des entérocytes et de les détruire en agissant sur le cytosquelette des cellules par polymérisation (ou condensation) des fibres d'actine (Figure 4) : il en résulte un défaut d'absorption sur une très longue durée correspondant au temps nécessaire à la formation de nouvelles villosités. Les colibacilles EHEC ont également la capacité de libérer des toxines (Stx 1, Stx 2) qui provoquent une immunodépression chez les veaux infectés (Croxen et Finlay, 2010).

Les signes observés lors de colibacilloses sont les signes classiques de gastro-entérites : diarrhées pouvant être hémorragiques si la colonisation de la muqueuse est importante, déshydratation, douleurs abdominales (Moxley et Smith, 2010 ; Heller et Chigerwe, 2018).

Quelques cas de colibacillose à colibacilles attachants-effaçants chez des bovins de plus d'un mois ont été répertoriés notamment chez des veaux de quatre et huit mois et chez une génisse de 19 mois (Janke *et al.*, 1990 ; Wada *et al.*, 1994 ; Pearson *et al.*, 1999).

Figure 4 : Physiopathologie des *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) (Belbis, 2017)



### 1.3.1.2. Salmonellose

Les salmonelles sont également des bactéries à coloration de Gram négative dont le réservoir principal est la vache adulte qui les dissémine dans l'environnement par le biais de ses selles et qui contamine ainsi des bovins plus jeunes par voie oro-fécale. La sous-espèce *Salmonella enterica* est la plus retrouvée chez les bovins avec deux sérovars en particuliers : les sérovars Typhimurium (on écrit plus simplement *S. Typhimurium*) et Dublin (*S. Dublin*) (Cho et Yoon, 2014).

Les salmonelles sont capables d'envahir la muqueuse intestinale notamment celle de l'iléon et de se multiplier dans un premier temps dans les structures lymphoïdes (plaques de Peyer, nœuds lymphatiques mésentériques) et dans un second temps dans les autres structures lymphoïdes de l'organisme en infectant les phagocytes mononuclés permettant leur dissémination. De Jong et Ekdahl (1965) ont montré que les salmonelles avaient la capacité d'infecter directement le tissu lymphoïde pharyngé, correspondant aux amygdales, sans passer par la voie habituelle d'infection des entérocytes. Plusieurs facteurs de virulence sont impliqués expliquant l'échappement immunitaire de salmonelloses (Heller et Chigerwe, 2018).

Les signes cliniques retrouvés lors de salmonellose sont des diarrhées nécrotiques et fibrineuses dans la plupart des cas et parfois hémorragiques (Figure 5), de l'anorexie, une hyperthermie marquée et des douleurs abdominales aiguës. Les salmonelles peuvent notamment être aussi responsables d'avortements et de problèmes respiratoires (Divers et Peek, 2008). Les salmonelloses cliniques sont dans la majorité des cas retrouvées chez des bovins âgés de 10 jours à trois mois d'âge. Les bovins adultes peuvent également souffrir de salmonellose mais les infections par les salmonelles sont très souvent asymptomatiques (Holschbach et Peek, 2018).

**Figure 5 : Aspect des selles hémorragiques chez un veau atteint de salmonellose (Peek et al., 2018)**



### **1.3.1.3. Campylobacteriose**

Le genre *Campylobacter* regroupe des bactéries à coloration de Gram négative très répandues dans les systèmes digestifs des mammifères et des oiseaux. Très peu rencontrées dans des cas de diarrhées chez les bovins, ces bactéries ont surtout été étudiées ces dernières années pour leur caractère zoonotique conséquent et leur antibiorésistance grandissante : en effet leur résistance aux fluoroquinolones et aux macrolides se révèle très inquiétante (Peek et al., 2018). Leur physiopathologie relative aux diarrhées néonatales reste également très peu connue.

Une étude a cependant mis en évidence le caractère potentiellement pathogène de trois bactéries de ce genre (*Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*) chez des veaux âgés de quatre mois présentant des syndromes diarrhéiques (Schulze, 1992).

### **1.3.1.4. Clostridiose**

*Clostridium perfringens* est une bactérie anaérobie Gram positive du genre *Clostridium* qui a la particularité de produire et de libérer des toxines nécrosantes et hémorragiques ; il existe actuellement sept toxinotypes de *Clostridium perfringens* (A, B, C, D, E, F et G) définis en fonction de la libération ou non par la bactérie d'une ou plusieurs de ces toxines : alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ), iota ( $\iota$ ), l'entérotoxine (CPE) et la toxine de l'entérite nécrosante (NetB) de *Clostridium perfringens* (Tableau 3) (Rood et al., 2018).

**Tableau 3 : Toxinotypes de *Clostridium perfringens* et leurs toxines associées (+ : libérée ; - : non libérée ; +/- : inconstant ; en rouge : toxinotypes touchant les bovins) (Rood *et al.*, 2018)**

*CPE : entérotoxine de Clostridium perfringens ; NetB : toxine de l'entérite nécrosante de Clostridium perfringens*

Sérotype	Toxine $\alpha$	Toxine $\beta$	Toxine $\epsilon$	Toxine $\iota$	Toxine CPE	Toxine Netb
<b>A</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>B</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>C</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+/-</b>	<b>-</b>
<b>D</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+/-</b>	<b>-</b>
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

Ces toxines peuvent être nécrosantes et/ou hémorragiques et induisent des syndromes diarrhéiques très violents entraînant systématiquement la mort rapide du bovin atteint. Le toxinotype C est celui qui est le plus retrouvé lors d'infection à *Clostridium perfringens*. Les types A, B et D sont également retrouvés chez les bovins mais plus rarement ; de plus, les clostridioses sont beaucoup plus fréquentes chez les veaux de moins d'un mois d'âge mais elles touchent également des veaux ayant jusqu'à trois mois d'âge (Cho et Yoon, 2014).

La toxine  $\beta$  retrouvée essentiellement dans les clostridioses de type C est responsable d'une nécrose des cellules épithéliales intestinales induisant des diarrhées profuses pouvant être mucoïdes ou hémorragiques, des distensions abdominales et la mort de l'animal très peu de temps après l'infection. Des signes nerveux dans les phases terminales peuvent également être constatés (Peek *et al.*, 2018)

Les clostridioses de type A, plus rares, induisent des hémorragies et des nécroses de la muqueuse abomasale par le biais de la toxine  $\alpha$  ; il en résulte également des diarrhées pouvant être hémorragiques avec un aspect goudronneux des selles. Des cas de péritonites par perforation de l'abomasum sont également répertoriés : la mort est également généralement inévitable dans le cas d'une clostridiose de type A (Peek *et al.*, 2018).

*Clostridium perfringens* est donc impliquée dans des cas de syndromes diarrhéiques chez des veaux ayant jusqu'à trois mois d'âge mais reste une cause très peu fréquente par rapport aux autres bactéries citées précédemment. Cho *et al.* (2013) en recherchant un panel très large d'agents pathogènes dont *Clostridium perfringens* dans les selles de veaux sains et de veaux présentant des diarrhées (presque 500 prélèvements sur des veaux de moins de six mois d'âge) n'ont jamais retrouvé la toxine caractéristique de la clostridiose de type C.

### 1.3.1.5. Diagnostic des infections bactériennes

Lorsque des agents bactériens sont suspectés dans l'apparition de ces symptômes, les prélèvements réalisés dans la grande majorité des cas sont des selles diarrhéiques et l'isolement sur culture gélosée est le test de référence, avec variation des milieux de cultures en fonction de la bactérie recherchée. Cependant, d'autres tests potentiellement plus sensibles et plus spécifiques peuvent être utilisés, telle que la PCR sur des prélèvements plus adaptés (Tableau 4). De plus, il faut être vigilant lorsque le diagnostic est établi puisque ces bactéries sont très souvent présentes naturellement, en tant que bactéries commensales dans le tractus digestif ; par exemple, si *Escherichia coli* est isolée, elle doit présenter des facteurs de virulence pour que l'on puisse l'incriminer dans l'apparition des signes cliniques. De la même façon, des signes cliniques caractéristiques de salmonellose doivent être identifiés lors de son isolement car les salmonelles sont très souvent retrouvées chez des bovins asymptomatiques (Francoz *et al.*, 2017).

**Tableau 4 : Prélèvements et tests réalisés lors de recherche de causes bactériennes de diarrhées chez les jeunes bovins (Francoz *et al.*, 2017)**

Bactérie		<i>Escherichia coli</i> attachant effaçant (EAEC)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
Prélèvement de choix	Animal vivant	Selles	Selles		Selles
	Animal mort	Iléon, côlon (contenu et paroi)	Iléon, côlon Noeud lymphatique mésentérique, rate, foie	Contenu du jéjunum (< 6 h post mortem, non congelé si dénombrement, anaérobiose)	Iléon, côlon
Tests réalisés en routine		Isolement et PCR ou PCR	Isolement (enrichissement, milieux sélectifs) sérotypage	Dénombrement Détection de toxine (ELISA) Gram (morphologie)	Isolement milieux spécifiques
Tests possibles		Histopathologie	PCR	PCR	PCR, Histopathologie



## 1.3.2. Infections virales

### 1.3.2.1. Coronavirus

Les coronavirus bovins sont des virus de la famille des *Coronaviridae* appartenant au genre *Betacoronavirus* présentant une enveloppe et un matériel génétique sous forme d'un seul brin d'ARN de polarité positive. Ces virus sont rencontrés le plus souvent chez des veaux d'une à quatre semaines d'âge souffrant de syndromes diarrhéiques mais ils sont également rencontrés chez des veaux plus âgés (jusqu'à cinq mois d'âge) et même chez des adultes particulièrement dans les cas de dysenterie hivernale. Des signes respiratoires peuvent également être constatés lors d'infection au coronavirus bovin chez des bovins âgés de plus de trois mois mais aussi chez de plus jeunes veaux présentant la forme entérique, on parle de « pneumoentérite » (Boileau et Kapil, 2010).

De la même façon que la plupart des virus à tropisme digestif, les coronavirus vont pénétrer dans l'organisme par voie oro-fécale et vont utiliser la machinerie cellulaire du veau pour se multiplier. Cette multiplication va entraîner une destruction des entérocytes notamment au niveau de l'intestin grêle et du colon et l'apparition de diarrhées par maldigestion malabsorption par abrasion des villosités intestinales (Hodnik *et al.*, 2020).

Les signes rencontrés sont typiques d'une gastro-entérite : diarrhées profuses parfois légèrement mucoïdes ou hémorragiques, douleurs abdominales, acidose et déshydratation sévère. Lors de dysenterie hivernale chez les bovins adultes, les signes cliniques rencontrés sont similaires avec des cas qui se résolvent spontanément chez la plupart des bovins touchés. Des formes plus graves existent chez les jeunes adultes présentant des diarrhées très hémorragiques et des anémies sévères provoquant généralement la mort de l'animal (Hodnik *et al.*, 2020).

### 1.3.2.2. Virus de la BVD

Le virus de la BVD (« *Bovine Viral Diarrhoea* ») fait partie du genre *Pestivirus* de la famille des *Flaviviridae* ; c'est également un virus enveloppé à simple brin d'ARN de polarité positive. La particularité de ce virus réside dans le développement de veaux Infectés Persistants Immunotolérants (IPI) lors d'infection *in utero* entre le début du deuxième mois et la fin du quatrième mois de gestation : le virus est donc considéré comme faisant partie du soi par l'organisme du veau du fait de l'absence de réponse immunitaire dans cette période de gestation. Ces veaux IPI ne présentent donc presque jamais de symptômes mais peuvent développer une maladie bien particulière au cours de leur vie (*cf infra*) et sont des réservoirs majeurs d'excrétion virale ; ils peuvent néanmoins être plus réceptifs que des veaux non-IPI aux autres agents responsables de diarrhées (Heller et Chigerwe, 2018)

Lors d'infection avec le virus de la BVD après la naissance, la forme la plus courante est la forme diarrhéique touchant préférentiellement des bovins âgés de six à 24 mois : cette forme consiste en l'apparition de diarrhées souvent bénignes ; néanmoins on peut retrouver dans certains cas des diarrhées mucoïdes parfois teintées de sang, de l'abattement, une fièvre transitoire et de l'anorexie. D'autres formes existent notamment des formes respiratoires et hémorragiques mais cette infection peut également se révéler asymptomatique chez un bovin non-IPI (Peek *et al.*, 2018). Ce virus cause également des malformations congénitales et des avortements lors d'infections *in utero* pendant des périodes bien spécifiques de la gestation (Khodakaram-Tafti et Farjanikish, 2017)

La particularité des veaux IPI est le développement des années après la contamination *in utero* d'une maladie bien spécifique : la maladie des muqueuses (MD : « *Mucosal Disease* »). Cette maladie causant inévitablement la mort se caractérise par la présence de diarrhées avec hématochézie associées à de la fièvre et dans certains cas des lésions ulcératives buccales, nasales et interdigitées (Figure 6).

**Figure 6 : Ulcérations caractéristiques de la maladie des muqueuses (MD) chez une génisse IPI (Peek *et al.*, 2018)**



Cho *et al.* (2013), de la même façon que pour *Clostridium perfringens*, n'ont quasiment pas retrouvé ce virus dans les prélèvements effectués sur les veaux sains et atteints de diarrhées de leur étude (0,5 % des veaux atteints de diarrhées et 0,4 % des veaux sains) (*cf* § 1.3.1.4.).

### **1.3.2.3. Autres virus**

De nombreux autres virus ont été identifiés chez des veaux atteints de diarrhées ; la pathogénicité de ces virus reste néanmoins très peu connue et ils sont retrouvés dans de très nombreux cas de co-infection impliquant d'autres agents pathogènes retrouvés plus classiquement. Ce sont également des virus ayant une prévalence aussi élevée voire plus forte chez des veaux sains que chez des veaux présentant des symptômes ; leur implication doit donc être davantage étudiée (Tableau 5) (Gomez et Weese, 2017).

**Tableau 5 : Caractéristiques d'autres virus identifiés dans des cas de diarrhée chez de jeunes bovins (Gomez et Weese, 2017)**

Virus	Genre	Famille	Âge d'apparition de la diarrhée	Références
Torovirus bovins	<i>Torovirus</i>	<i>Coronaviridae</i>	Possible jusqu'à 5 mois d'âge	(Koopmans <i>et al.</i> , 1991)
Norovirus bovins groupe III	<i>Norovirus</i>	<i>Caliciviridae</i>	Essentiellement avant cinq semaines d'âge	(Cho <i>et al.</i> , 2013)
Nebovirus bovins	<i>Nebovirus</i>	<i>Caliciviridae</i>	Entre un et quatre mois d'âge	(Van der Poel <i>et al.</i> , 2003 ; Cho <i>et al.</i> , 2013)
Astrovirus bovins	<i>Astrovirus</i>	<i>Astroviridae</i>	Veau de moins d'un mois d'âge, vaches adultes : incertain	(Sharp <i>et al.</i> , 2015)
Aichivirus B	<i>Kobuvirus</i>	<i>Picornaviridae</i>	Essentiellement avant l'âge d'un mois mais identifié également plus tard	(Jeoung <i>et al.</i> , 2011)
Enterovirus bovins	<i>Enterovirus</i>	<i>Picornaviridae</i>	Développé en détail dans le paragraphe 2. de cette partie bibliographique	

#### **1.3.2.4. Diagnostic des infections virales**

Le test de référence pour la détection d'une infection virale est la culture cellulaire. Il existe cependant beaucoup d'autres moyens permettant d'incriminer des virus tels que l'immunofluorescence, la PCR, la RT-PCR, les tests ELISA et le séquençage nouvelle génération. Les techniques de PCR sont tout de même celles qui sont utilisées dans toutes les études sur les virus citées dans ce travail. La majorité de ces techniques sont détaillées dans l'exemple des entérovirus bovins dans la seconde partie de cette partie bibliographique (*cf* § 2.4.).

### 1.3.3. Infections parasitaires

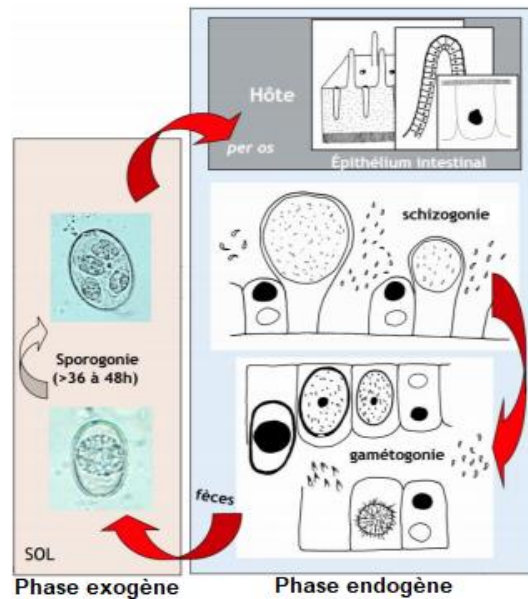
#### 1.3.3.1. Coccidiose

Les coccidioses chez les bovins sont causées par des protozoaires qui constituent trois espèces du genre *Eimeria* : *Eimeria alabamensis*, *Eimeria bovis* et *Eimeria zuernii*. D'autres espèces peuvent être rencontrées chez les bovins mais elles ne présentent aucune pathogénicité. Ce sont des espèces très spécifiques d'hôtes qui ne touchent que l'espèce bovine. Très souvent asymptomatiques, les infestations par les coccidies peuvent néanmoins provoquer des syndromes diarrhéiques chez le veau de plus de trois semaines d'âge après un stress important : le facteur de stress le plus constaté pouvant déclencher une coccidiose clinique est le sevrage mais d'autres causes sont également identifiées telles que l'écornage, le changement de lot ou le transport. On considère que l'immunité contre les coccidioses s'installe à partir d'un an d'âge mais les animaux infestés restent d'importants réservoirs pour les animaux plus jeunes du fait d'une forte excrétion dans les selles (Keeton et Navarre, 2018). Les coccidioses cliniques impliquent également très souvent plusieurs espèces du genre *Eimeria* ; cependant lorsqu'une coccidiose est suspectée, les espèces de coccidies ne sont quasiment jamais différenciées entre elles (Blaga, 2016).

Le cycle des espèces du genre *Eimeria* dure entre deux et quatre semaines en fonction de l'espèce et des conditions climatiques ; il s'agit d'un cycle monoxène en deux phases : une phase exogène dans l'environnement où les oocystes non sporulés libérés dans l'environnement par les animaux porteurs sporulent lorsque les conditions d'humidité, de température et d'oxygénation sont réunies (sporogonie) et une phase endogène où l'oocyste sporulé ingéré par le bovin libère des sporozoïtes qui infectent les entérocytes au niveau de la portion jéjuno-iléale, du caecum et du colon. Il en découle la formation de schizozoïtes formes asexuées (schizogonie), puis la formation de gamètes (microgamètes et macrogamètes) formant par leur union des oocystes non sporulés (gamétogonie) (Figure 7). Ces oocystes sont ensuite libérés dans la lumière intestinale par lyse cellulaire, phase impliquée dans la survenue des signes cliniques de la coccidiose.

Les signes cliniques retrouvés lors de coccidioses sont essentiellement des diarrhées pouvant être mucoïdes et hémorragiques avec la présence de lambeaux de muqueuses, de la douleur abdominale, de la déshydratation, de l'abattement et de l'hyperthermie pouvant atteindre 41°C ; sans traitement adéquat, le bovin infesté meurt assez rapidement. Des signes nerveux peuvent également être constatés lors de coccidiose à *Eimeria zuernii* comme des trémulations, des convulsions et des états de coma ; la mort survient dans 80 à 90 % des cas (Keeton et Navarre, 2018).

**Figure 7 : Cycle des espèces du genre *Eimeria* (Blaga, 2016)**



Kim *et al.* (2018) ont mis en évidence la présence d'une autre espèce du genre *Eimeria* dans les selles de veaux présentant des diarrhées juste avant le sevrage : *Eimeria bukidnonensis*. Cette espèce est celle qui a été la moins retrouvée par rapport aux autres espèces plus classiques du genre *Eimeria* mais elle a uniquement été identifiée chez des veaux infectés alors que les autres espèces ont également été retrouvées chez des veaux sains. Sa réelle implication dans ces diarrhées nécessite cependant d'être confirmée par d'autres études.

### 1.3.3.2. *Giardiose*

Cette parasitose est causée par un protozoaire extra-cellulaire du tube digestif : *Giardia duodenalis* ; cette espèce est composée de huit génotypes touchant la plupart des mammifères dont l'Homme. Les génotypes A, B et E sont les trois seuls identifiés chez l'espèce bovine et le génotype E est le plus commun (Peek *et al.*, 2018). La tranche d'âge la plus touchée se situe entre quinze jours et deux mois d'âge (Heller et Chigerwe, 2018).

Son cycle est également monoxène avec une phase exogène dans l'environnement où *Giardia duodenalis* est sous forme kystique et une phase endogène au sein de l'hôte où le protozoaire, après avoir été ingéré, se fixe au niveau des apex des entérocytes et entame une multiplication végétative par bipartition ; il en découle l'enkystation d'adultes qui sont libérés dans l'environnement et le cycle peut ainsi recommencer.

Les signes cliniques constatés lors de giardioses sont des diarrhées avec des selles très décolorées (stéatorrhée), une faible déshydratation et une perte de poids mais ces signes cliniques sont très fréquemment absents lorsque ce parasite est diagnostiqué (Santin, 2020). De plus, l'association entre la présence de *Giardia duodenalis* et les signes cliniques constatés n'a jamais pu être confirmée avec certitude et la présence d'autres agents pathogènes plus virulents tels que les espèces du genre *Eimeria* ou *Cryptosporidium parvum* pour les veaux plus jeunes est souvent mise en évidence en même temps que ce parasite. Autrement dit le postulat de Koch n'a jamais pu être démontré jusqu'aujourd'hui pour ce parasite (Heller et Chigerwe, 2018 ; Peek *et al.*, 2018)

### 1.3.3.3. Nématodoses

Les nématodes sont des organismes parasites très répandus chez les mammifères en particulier chez les bovins ; ils ont notamment un énorme impact économique dans le monde de l'élevage.

Ces parasites touchent des bovins de tout âge à partir de l'âge de trois semaines pour certains mais le stade de la vie du bovin où le risque est majeur est la première année de pâturage, fondamentale cependant pour que l'immunité s'installe (Heller et Chigerwe, 2018).

Le cycle de ces parasites est relativement commun à toutes les espèces avec une infestation par voie orale avec le stade larvaire L3 qui va se développer au sein de l'hôte pour former des formes pré-adultes L4 et L5 puis des formes adultes ; ces formes adultes vont alors pondre des œufs qui seront excrétés par la suite dans les selles de l'hôte. Ces œufs vont alors éclore dans l'environnement et de nouveaux stades larvaires vont se former (Figure 8). Les localisations des adultes et les périodes prépatentes diffèrent d'une espèce à l'autre (Tableau 6).

Les signes cliniques constatés lors de nématodoses sont essentiellement digestifs mais certaines espèces induisent d'autres signes (Tableau 6).

**Figure 8 : Présentation générale du cycle des nématodes gastrointestinaux chez les bovins (Adult worm : forme adulte de nématode ; egg : œuf de nématode) (Charlier *et al.*, 2020)**



**Tableau 6 : Présentation des nématodes les plus rencontrés chez les bovins en zone tempérée (Craig, 2018 ; Charlier *et al.*, 2020)**

Espèces	Localisation	Période prépatente (en jours)	Importance clinique	Symptômes fréquemment observés
<i>Ostertagia ostertagi</i>	Abomasum	21	+++	Gastrites, diarrhées
<i>Haemonchus placei</i>	Abomasum	18-21	+++	Diarrhées, anémies, œdème de l'auge
<i>Cooperia</i> spp.	Duodénum, jéjunum	12-21	++(+)	Diarrhées, perte de poids, anorexie
<i>Trichostrongylus</i> spp.	Abomasum	15-23	++	Diarrhées, anorexie, douleur abdominale, ostéodystrophie
<i>Nematodirus helvetianus</i>	Intestin grêle	21	++	Diarrhées, perte de poids, anorexie
<i>Oesophagostomum radiatum</i>	Caecum, colon	40-45	++	Diarrhées
<i>Trichuris discolor</i>	Caecum, colon	50-90	+(+)	Diarrhées lors de très importantes infestations

D'autres nématodes tels que ceux de la famille des *Toxocaridés* représentés par l'espèce *Toxocara viturolum* chez les bovins peuvent induire des diarrhées et de la perte d'état chez de très jeunes bovins dans de très rare cas et sans certitude d'association avec les signes cliniques constatés (Venjakob *et al.*, 2017).

#### **1.3.3.4. Diagnostic des infections parasitaires**

Le diagnostic des infections parasitaires se fait dans la majorité des cas par analyse coprologique ; l'observation microscopique d'une certaine quantité d'œufs ou de parasites permettra d'établir le diagnostic et de relier de façon la plus certaine possible les signes cliniques avec la présence du parasite. Le déroulement de l'examen coprologique varie également en fonction du parasite recherché ce que nous ne détaillerons pas ici.

Le dosage du pepsinogène sérique peut également être utile au diagnostic des parasites abomasaux notamment tels que *Ostertagia ostertagi* et les espèces de *Trichostrongylus* mais ce test n'est que très peu spécifique (Craig, 2018).

Enfin les tests PCR se révèlent également d'une grande fiabilité pour la détection des parasites, comme pour le diagnostic des autres causes infectieuses.

### **1.3.4. Causes non-infectieuses**

#### **1.3.4.1. Cause alimentaire**

L'alimentation mal contrôlée d'un veau ou même des vaches pendant la gestation peut se révéler être un facteur d'apparition de diarrhées de façon directe et indirecte : ainsi l'alimentation carencée des vaches durant le dernier tiers de gestation peut entraîner des carences en vitamines et en oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc et iode notamment) diminuant la résistance des veaux aux agents infectieux et ce même quelques mois après leur naissance. De façon plus directe, des diarrhées d'origine nutritionnelle peuvent apparaître lorsque les veaux sont alimentés avec des aliments d'allaitements ou avec du lait entier ; les aliments d'allaitement peuvent induire des diarrhées lorsqu'ils ne sont pas bien reconstitués (pas assez d'eau, temps de brassage insuffisant, température inadéquate), mal conservés (contamination bactérienne ou fongique, excès d'hydratation) et/ou mal distribués (hygiène du matériel d'alimentation). Le lait entier quant à lui induit des diarrhées lorsque la teneur en azote non protéique et/ou en matière grasse (teneur supérieure à 50 g/L de matière grasse) est trop élevée. Le lait de mammite non délivré en laiterie est également plus susceptible d'induire des diarrhées. Enfin, des diarrhées nutritionnelles peuvent apparaître si le sevrage alimentaire n'est pas réalisé de façon progressive (Francoz *et al.*, 2017).

#### **1.3.4.2. Syndrome du buveur ruminal**

Ce syndrome est décrit chez des veaux âgés de trois à huit semaines d'âge nourris au lait et plus particulièrement aux lactoreemplaceurs ; il se déclare lorsque l'alimentation lactée, qui shunte normalement les pré-estomacs des bovins avant le sevrage, s'accumule anormalement dans le rumen par défaillance de la fermeture de la gouttière œsophagienne. Il en résulte des météorisations anormales et le déclenchement d'une acidose. Des diarrhées très souvent grisâtres sont également rapportées et peuvent être présentes plusieurs semaines après la guérison.

Ce syndrome peut également apparaître lorsqu'un trop gros volume d'alimentation lactée est administré refluant de la caillette vers les pré-estomacs mais aussi lors d'un stress important, de sondages œsophagiens trop réguliers, d'une alimentation à l'aide de seaux sans tétines entre autres (Tableau 7) (Francoz *et al.*, 2017).



**Tableau 7 : Causes principales d'apparition du syndrome du buveur ruminal (Francoz *et al.*, 2017)**

<b>Forme aiguë</b>	
<b>Secondaire à une autre maladie avec répercussions systémiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrhée néonatale</li> <li>• Anorexie primaire</li> <li>• Toutes les conditions à l'origine de douleur ou inconfort : toux douloureuse, otite, phlébite veine jugulaire</li> </ul>
<b>Forme chronique</b>	
<b>Techniques d'alimentation inadéquates</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heure des repas irrégulière</li> <li>• Lait de remplacement de mauvaise qualité</li> <li>• Préparation inadéquate du lait, température du lait froide</li> <li>• Alimentation au seau sans tétine</li> </ul>
<b>Alimentation forcée</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Passage du tube à gaver inadéquat et douloureux à l'origine d'une fermeture réflexe de la gouttière œsophagienne</li> <li>• Sondages – gavages trop fréquents</li> </ul>
<b>Stress</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport sur de longues distances, regroupements dans des unités d'engraissement</li> </ul>

#### **1.3.4.3. Cause iatrogène**

Un traitement à base d'antibiotiques pour traiter une maladie concernant un autre appareil tel que l'appareil respiratoire, très touché lui aussi par une multitude d'agents pathogènes, est susceptible d'induire des diarrhées chez un veau (Belbis, 2017).

## 1.4. Etiologie : bilan

- Les diarrhées du jeune bovin peuvent être causées par de nombreux agents pathogènes pouvant être des bactéries, des virus, des parasites mais aussi par des causes non-infectieuses qui sont surtout alimentaires (Tableau 1).
- Certains agents pathogènes ne peuvent pas être responsables de diarrhées avant l'âge d'un mois, notamment les parasites (sauf *Cryptosporidium parvum*), et d'autres agents sont très peu voire jamais identifiés chez des veaux de plus d'un mois.
- Les signes cliniques rencontrés lors de ces syndromes diarrhéiques sont très similaires quel que soit l'agent pathogène responsable et il est difficile, voire impossible, de les distinguer sur la seule base des commémoratifs et de l'examen clinique d'où la nécessité d'établir un diagnostic à l'aide d'examens complémentaires.
- Les causes de diarrhées chez le jeune bovin sont très souvent multifactorielles, compliquant un peu plus l'application des postulats de Koch dans l'incrimination d'un agent pathogène en particulier ; ces postulats sont également très compliqués à mettre en œuvre puisqu'une part non négligeable des agents pathogènes potentiellement responsables sont retrouvés chez des individus asymptomatiques.

## 2. Entérovirus bovins

### 2.1. Présentation

#### 2.1.1. Taxonomie

##### 2.1.1.1. Famille des *Picornaviridae*

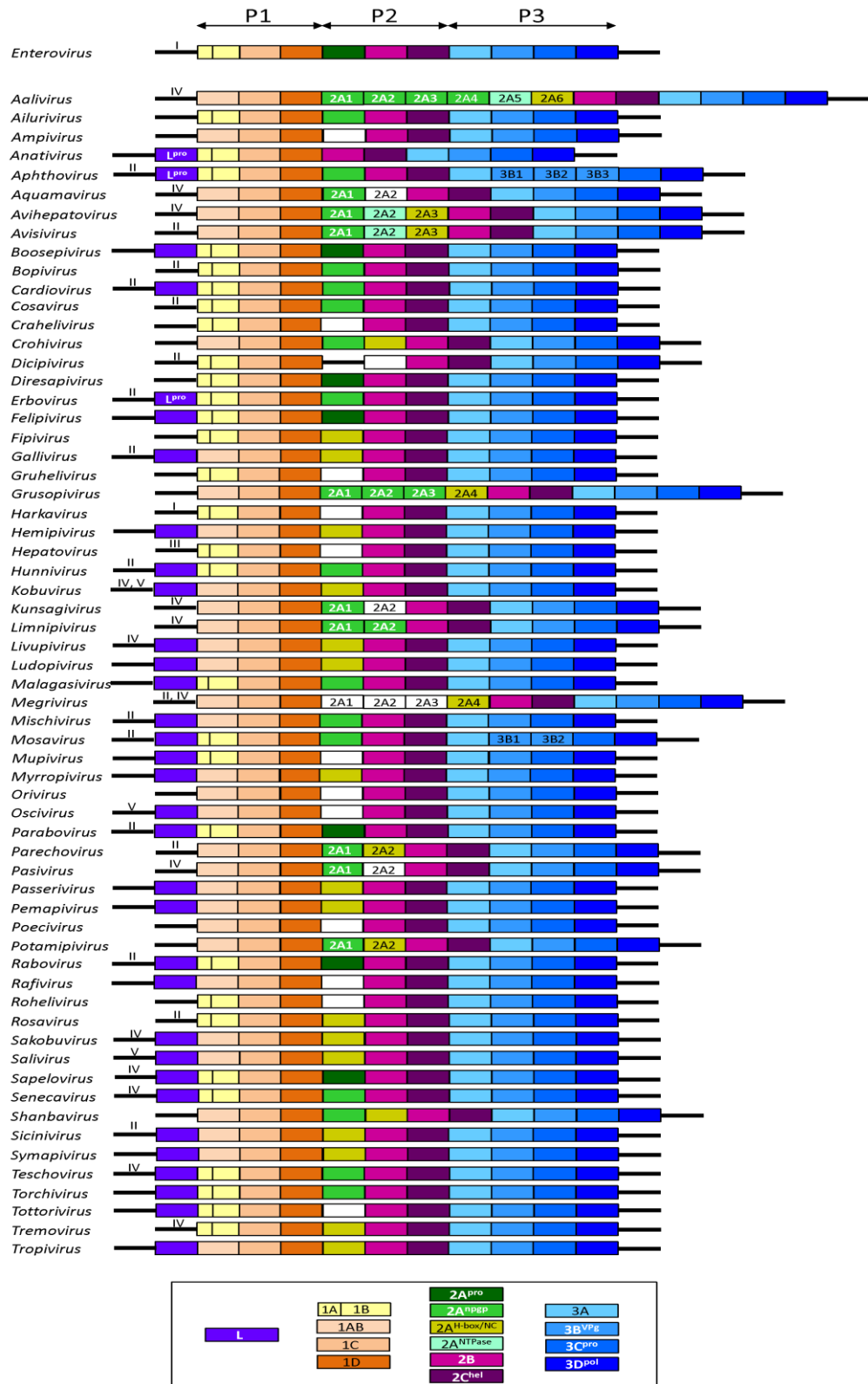
Les entérovirus bovins font partie de la famille des *Picornaviridae*. Cette famille est caractérisée par des virus non enveloppés à simple brin d'ARN de polarité positive mesurant entre 30 et 32 nanomètres (nm) de diamètre. Ce sont des virus qui ont un énorme impact sur le monde animal tant sur le plan sanitaire que sur le plan économique. Ainsi, la fièvre aphteuse (Espèce : foot-and-mouth disease virus (FMDV), genre : *Aphthovirus*, famille : *Picornaviridae*), classée danger sanitaire de première catégorie soumise à un plan national d'intervention sanitaire d'urgence en France, a eu des conséquences désastreuses en Europe au cours du XX<sup>e</sup> siècle jusqu'au dernier épisode en 2001 (Diaz-San Segundo *et al.*, 2017). Cette famille de virus touche également l'espèce humaine avec des maladies importantes comme la poliomyélite et l'hépatite A entre autres.

Zell *et al.* (2017) ont mis en évidence dans la mise à jour de leur publication en septembre 2020 que la famille des *Picornaviridae* était constituée actuellement de plus de 140 espèces réparties en 63 genres dont celui des entérovirus (Figure 9). La plupart de ces genres touchent les cinq grandes classes de vertébrés : les oiseaux (*Tremovirus*, *Gruhelivirus*), les poissons (*Limnipivirus*, *Potamipivirus*, *Fipivirus*), les reptiles tels que les serpents (*Myrropivirus*) et les tortues (*Pemapivirus*, *Rafivirus*, *Torchivirus*), les amphibiens (*Livupivirus*) et les mammifères tels que l'Homme (*Salivirus*, *Parechovirus*) et les porcs (*Senecavirus*, *Teschovirus*). Les bovins sont également touchés par plusieurs autres genres de cette famille : *Boosepivirus*, *Bopivirus*, *Kobuvirus*, *Aphthovirus*, *Sapelovirus*. La physiopathologie des virus de la plupart de ces genres reste néanmoins très peu connue.

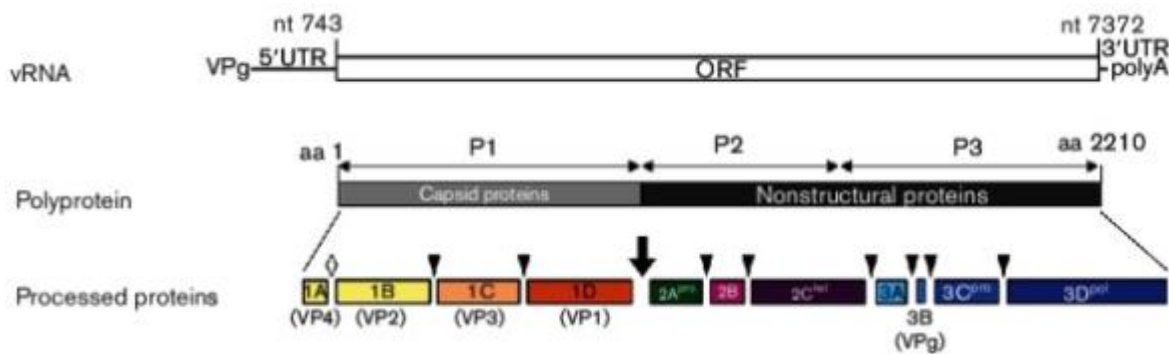
L'explosion du nombre de genres découverts ces dernières années est due au développement toujours plus poussé de nouvelles technologies en particulier de l'utilisation accrue du séquençage nouvelle génération (NGS) ; de cette façon, certains virus découverts font partie de la famille de par leur proximité génétique mais ne peuvent faire partie d'aucun genre existant car trop éloignés génétiquement des virus appartenant à ces genres (*cf infra*).

Leurs structures génétiques et l'expression des protéines qui en découle sont similaires, avec une polyprotéine (P1) qui code, dans la très grande majorité des cas, quatre protéines structurales formant les protomères de la capsid, nommées VP1, VP2, VP3 et VP4, et deux polyprotéines (P2 et P3) qui codent au minimum sept protéines non structurales (Figures 9, 10 et 11). Certains genres de la famille rassemblent des virus qui ne possèdent que trois protéines structurales comme le genre *Parechovirus* regroupant des virus qui induisent de graves septicémies chez le nourrisson (Olijve *et al.*, 2017).

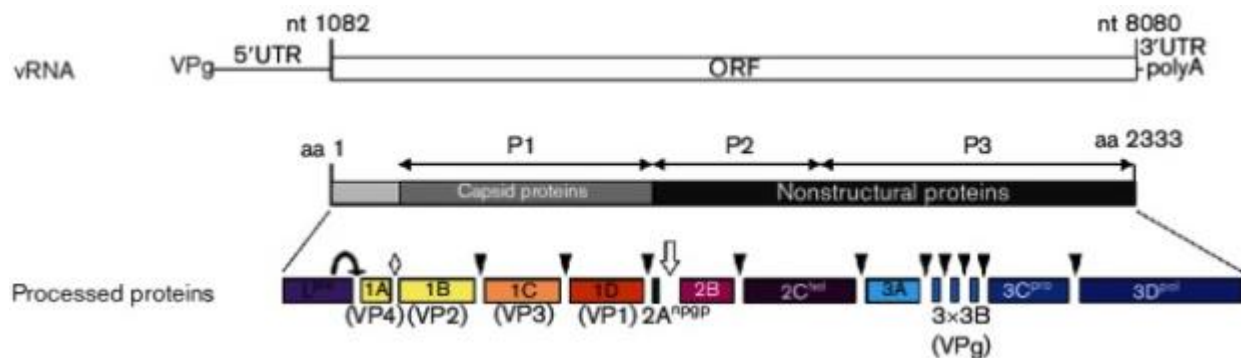
Figure 9 : Liste actualisée des genres de la famille des *Picornaviridae* avec schéma de l'organisation génétique de chacun de ces genre (Zell et al., 2017)



**Figure 10 : Détail de la structure et de l'expression génétique du poliovirus 1 (Espèce : *Enterovirus C*, Genre : *Enterovirus*) (Zell et al., 2017)**



**Figure 11 : Détail de la structure et de l'expression génétique du virus de la fièvre aphteuse (Espèce : Foot-and-mouth disease virus, Genre : *Aphthovirus*) (Zell et al., 2017)**



Ainsi, la classification de la famille des *Picornaviridae* est entièrement basée sur cette structure génétique et sur les protéines qui lui sont associées (Zell et al., 2017) :

On considère donc que deux virus appartiennent à la même espèce si et seulement si :

- Ils partagent un pourcentage significativement élevé d'acides aminés en commun dans la structure de leur P1 respective c'est-à-dire du polypeptide d'où sont issues les protéines structurales, et dans la structure des protéines non structurales 2C, 3C et 3D (Figures 10 et 11).
- Ils font partie du même groupe monophylétique.
- Ils ont exactement la même carte génétique.

De la même façon, on considère que deux virus font partie du même genre si et seulement si :

- Les structures de leur protéine P1 sont semblables à au moins 33 % et les structures de leurs protéines 2C, 3C et 3D sont semblables entre elles à au moins 36 %.
- Ils font partie du même groupe monophylétique
- Les structures de leurs protéines non structurales L, 2B, 3A et 3B, lorsque celles-ci sont présentes comme dans le genre *Aphthovirus* (Figure 11), sont identiques.

Il découle de cette classification particulière la présence de virus qui n'ont pas le même tropisme d'espèce ou les mêmes particularités physico-chimiques au sein de mêmes genres. Par exemple, le genre *Enterovirus* regroupe des espèces de virus qui touchent à la fois l'Homme (*Rhinovirus A, B, et C*) et différentes espèces animales (*Enterovirus E et F* chez les bovins, *Enterovirus G* chez les porcins) (Bessaud *et al.*, 2018). Réciproquement, deux virus ayant des tropismes et des propriétés très similaires peuvent faire partie de deux genres différents tels que les rhinovirus équins A et B (ERAV et ERBV) appartenant respectivement aux genres *Aphovirus* et *Erbovirus* et responsables de symptômes identiques chez le cheval (Horsington *et al.*, 2013).

### **2.1.1.2. Le genre *Enterovirus***

Dans un souci d'homogénéité, la nomenclature du genre *Enterovirus* dans cette thèse suivra les recommandations de Simmonds *et al.* établies en 2020.

La classification du genre *Enterovirus* de la famille des *Picornaviridae* n'a cessé d'évoluer jusqu'à se stabiliser en 2017 avec la formation de 12 espèces d'entérovirus (EV-A à EV-L) et trois espèces de rhinovirus (RV-A, RV-B et RV-C) (Bessaud *et al.*, 2018) ; l'arbre phylogénétique présentant les différents entérovirus et rhinovirus connus présenté dans la figure 12 montre bien que les différentes espèces appartiennent au même genre par la présence d'un ancêtre commun. De plus, cet arbre est construit en utilisant les séquences peptidiques du polypeptide P1 de chaque sérotype.

Chaque espèce de ce genre est constituée d'un ou plusieurs sérotypes dont la plupart ont été découverts ces dernières années ; l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) estime en 2020 qu'il existe plus de 300 sérotypes répertoriés au sein du genre *Enterovirus* (Tableau 8). De plus, l'ICTV a très récemment actualisé les conditions d'appartenance pour un virus à une espèce d'entérovirus donnée : ainsi, on considère qu'un entérovirus appartient à une espèce d'entérovirus si :

- La polyprotéine complète (P1+P2+P3) est homologue à celle des virus de l'espèce à plus de 70 % dans sa chaîne d'acides aminés.
- La polyprotéine P1 est homologue à celle des virus de l'espèce à plus de 60 % dans sa chaîne d'acides aminés.
- Les protéines non structurales 2C, 3C et 3D ont une chaîne d'acides aminés homologue à celles des virus de l'espèce à plus de 70 %.
- Sa carte génétique est identique à celles des virus de l'espèce.

La création de nouvelles espèces d'entérovirus fut permise par la découverte de nouveaux entérovirus ne pouvant être classés parmi les espèces déjà existantes du fait de leurs structures trop éloignées de celle des virus déjà classés et identifiés. Certains virus découverts récemment n'appartiennent à aucune espèce pour le moment comme les virus simiens EV-122 et EV-123 (Figure 12) ou nécessitent une reconsidération des paramètres d'inclusion au sein d'une espèce : c'est notamment le cas du virus nommé BEV-AN12 (Tsuchiaka *et al.*, 2017) ; il s'agit d'un entérovirus bovin relativement proche des virus de l'espèce *Enterovirus F* mais dont la partie qui code sa

protéine structurale VP1 est trop différente de celle des entérovirus de l'espèce lors de sa découverte. Cependant une baisse des exigences concernant l'appartenance à l'espèce établie très récemment par l'ICTV a permis de le classer dans le septième sérotype de l'espèce *Enterovirus F* (EV-F7) ; ceci explique le fait qu'il ne soit pas encore placé dans l'espèce en 2018 comme on peut le voir sur la figure 12.

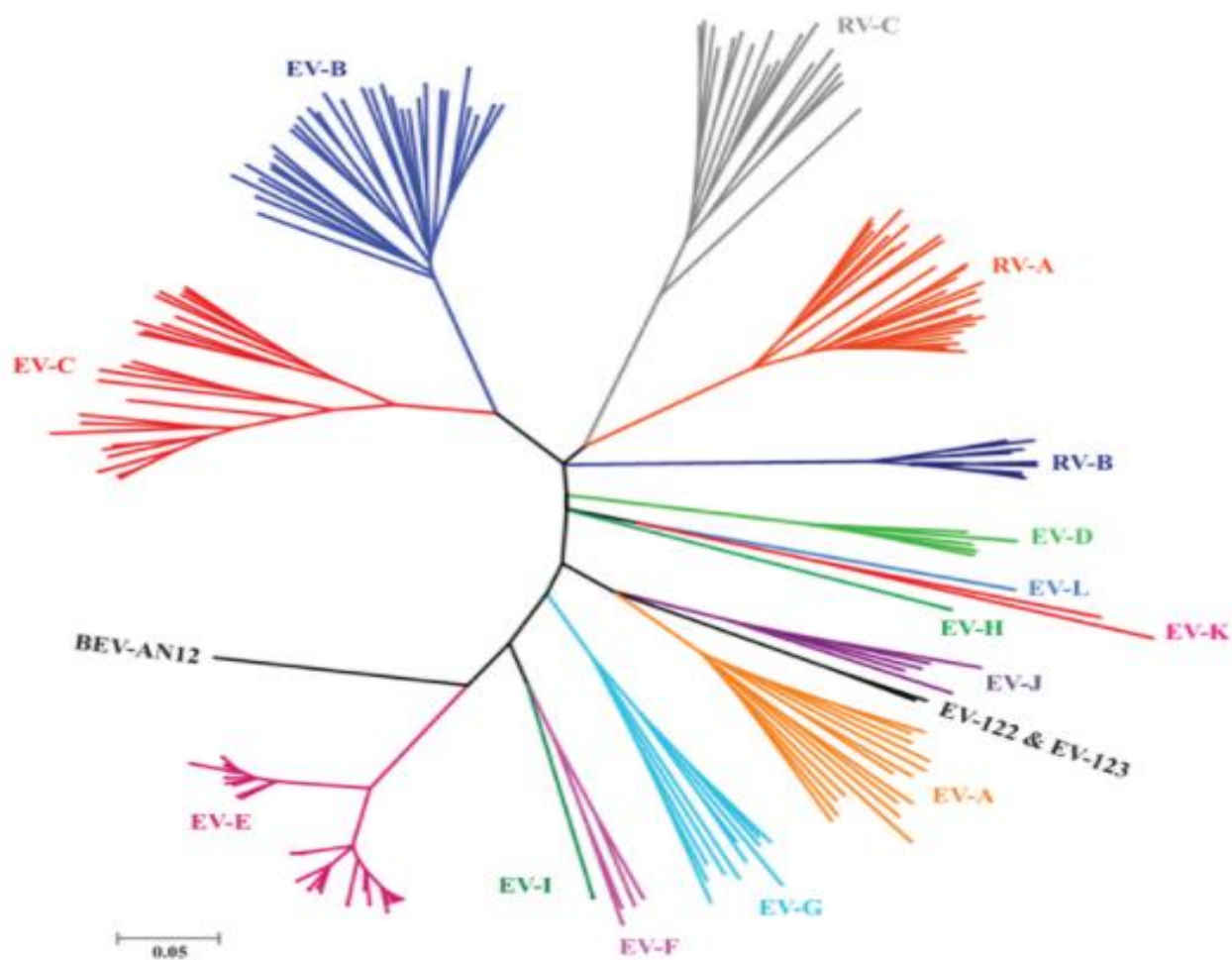
Les genres *Rhinovirus* et *Enterovirus* étaient distincts jusqu'en 2012 où le genre *Rhinovirus* a été inclus dans le genre *Enterovirus* (Figure 13). On peut également constater que les entérovirus bovins qui ont toujours fait partie d'une unique espèce du genre *Enterovirus* depuis leur découverte ont été répartis dans deux espèces différentes à partir de 2017 (*Enterovirus E* et *F*).

La structure des virus du genre *Enterovirus* est typique de celle d'un virus de la famille des *Picornaviridae* et sera présentée de façon plus précise lors de la présentation de la structure des entérovirus bovins dans les paragraphes suivants.

**Tableau 8 : Nomenclature, composition actuelle et spectre d'hôte des différentes espèces du genre *Enterovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2020)**

Genre <i>Enterovirus</i>			
Espèce	Nombre de sérotypes connus à ce jour	Espèces sensibles	Abréviation
<i>Enterovirus A</i>	25	<b>Homme</b> , gorilles, singes	EV-A
<i>Enterovirus B</i>	63	<b>Homme</b> , singes	EV-B
<i>Enterovirus C</i>	23	Homme	EV-C
<i>Enterovirus D</i>	5	<b>Homme</b> , gorilles, singes	EV-D
<i>Enterovirus E</i>	5	<b>Bovins</b> , grand dauphin (Nollens <i>et al.</i> , 2009)	EV-E
<i>Enterovirus F</i>	7	<b>Bovins</b> , opossums (Zheng, 2007), Alpaga (McClenahan <i>et al.</i> , 2013)	EV-F
<i>Enterovirus G</i>	22	<b>Porcs</b> , chèvres (Wang <i>et al.</i> , 2017)	EV-G
<i>Enterovirus H</i>	1	Singes	EV-H
<i>Enterovirus I</i>	1	Dromadaire (Woo <i>et al.</i> , 2015)	EV-I
<i>Enterovirus J</i>	6	Singes	EV-J
<i>Enterovirus K</i>	2	Rongeurs (Du <i>et al.</i> , 2016)	EV-K
<i>Enterovirus L</i>	1	Singes	EV-L
<i>Rhinovirus A</i>	80	Homme	RV-A
<i>Rhinovirus B</i>	32	Homme	RV-B
<i>Rhinovirus C</i>	57	Homme	RV-C

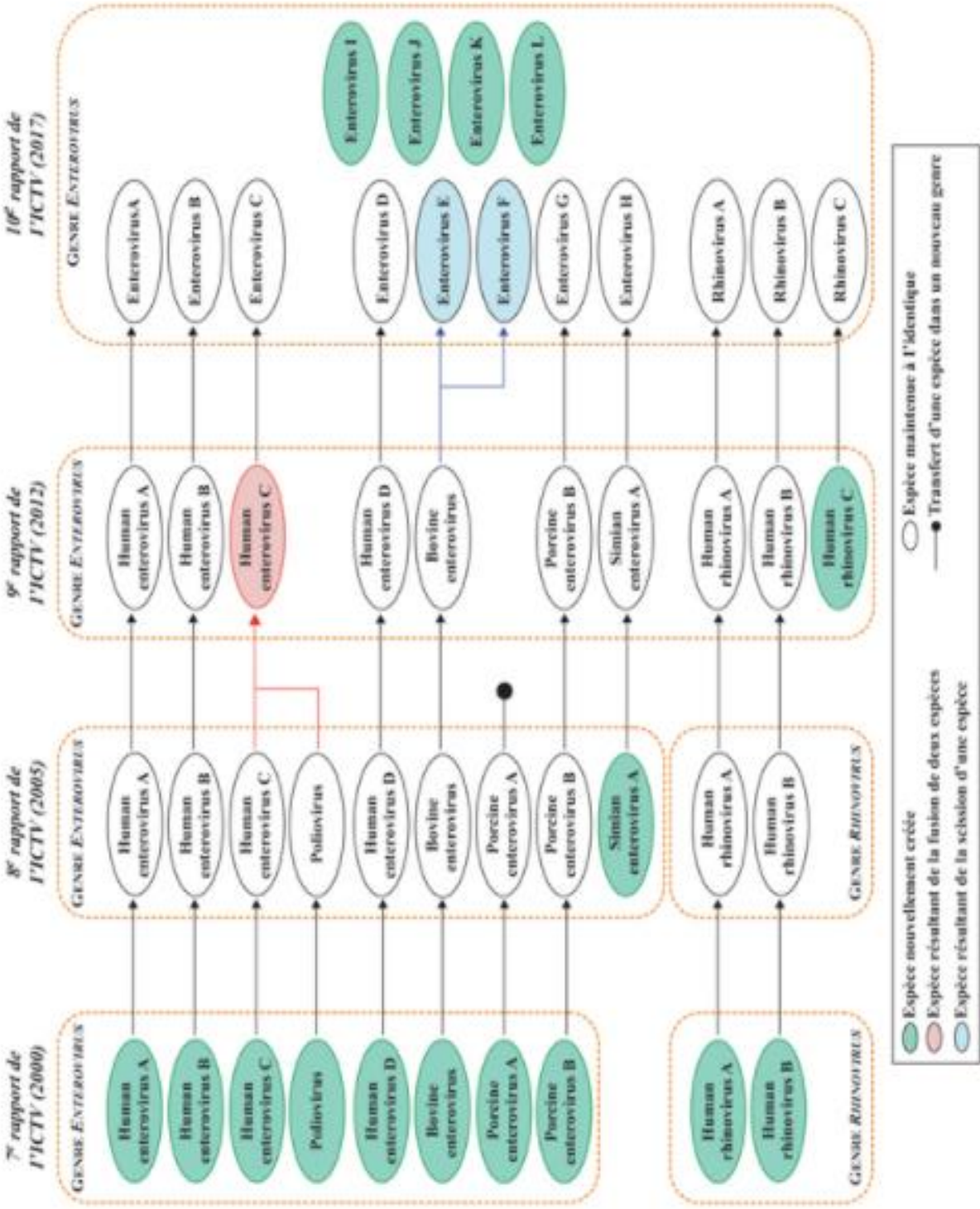
Figure 12 : Arbre phylogénétique présentant les différentes espèces d'entérovirus et de rhinovirus (Bessaud *et al.*, 2018)



Les abréviations présentes dans cet arbre reprennent celles du tableau 7



Figure 13 : Évolution de la nomenclature du genre *Enterovirus* depuis 2000 (Bessaud *et al.*, 2018)



## 2.1.2. Les entérovirus bovins

### 2.1.2.1. Description

Les premiers entérovirus bovins (Famille : *Picornaviridae*, Genre : *Enterovirus*, espèces *Enterovirus E* et *F*) ont été découverts dans les années 1950 lors de la mise en évidence d'un effet cytopathique à partir de prélèvements de selles de bovins âgés de quatre mois présentant des épisodes de fièvre et des symptômes respiratoires marqués et sur des prélèvements de liquides placentaires sur des vaches ayant avorté et présentant également des épisodes de fièvre (Moll et Finlayson, 1957). Ce virus est baptisé BEV-1, premier entérovirus bovin découvert, et sera décrit plus précisément dans les années 1970 (Taylor *et al.*, 1974). Depuis, d'autres entérovirus bovins ont été régulièrement découverts, séquencés avec précision et classés en deux espèces distinctes depuis 2017 (Figure 13) ; l'espèce *Enterovirus E* est à ce jour composée de cinq sérotypes différents, BEV-1 faisant partie du premier sérotype de l'espèce, tandis que l'espèce *Enterovirus F* est composée de 7 sérotypes. Chaque sérotype est dorénavant nommé en utilisant le préfixe « EV » suivi de la lettre correspondant à l'espèce et du numéro attribué à chaque sérotype : par exemple, le premier sérotype de l'espèce F est nommé : EV-F1 (Tableau 9) (Simmonds *et al.*, 2020).

**Tableau 9 : Présentation des sérotypes connus des deux espèces d'entérovirus bovins associés à leur virus de référence (ICTV, 2020)**

Espèce	Sérotype	Virus de référence du sérotype	
		Nom	Espèce hôte / lieu de découverte
<i>Enterovirus E</i>	EV-E1	VG-5-27	Bovins
	EV-E2	ATCC VR-758	Bovins
	EV-E3	D 14/3/96	Bovins
	EV-E4	PAK-NIH-21E5	Eaux usées
	EV-E5	MexKSU/5	Bovins
<i>Enterovirus F</i>	EV-F1	BEV-261-M2-RM2	Bovins
	EV-F2	PS89	Bovins
	EV-F3	PS87	Bovins
	EV-F4	W1	Opossums
	EV-F5	M80	Bovins
	EV-F6	T11f	Bovins
	EV-F7	AN12	Bovins

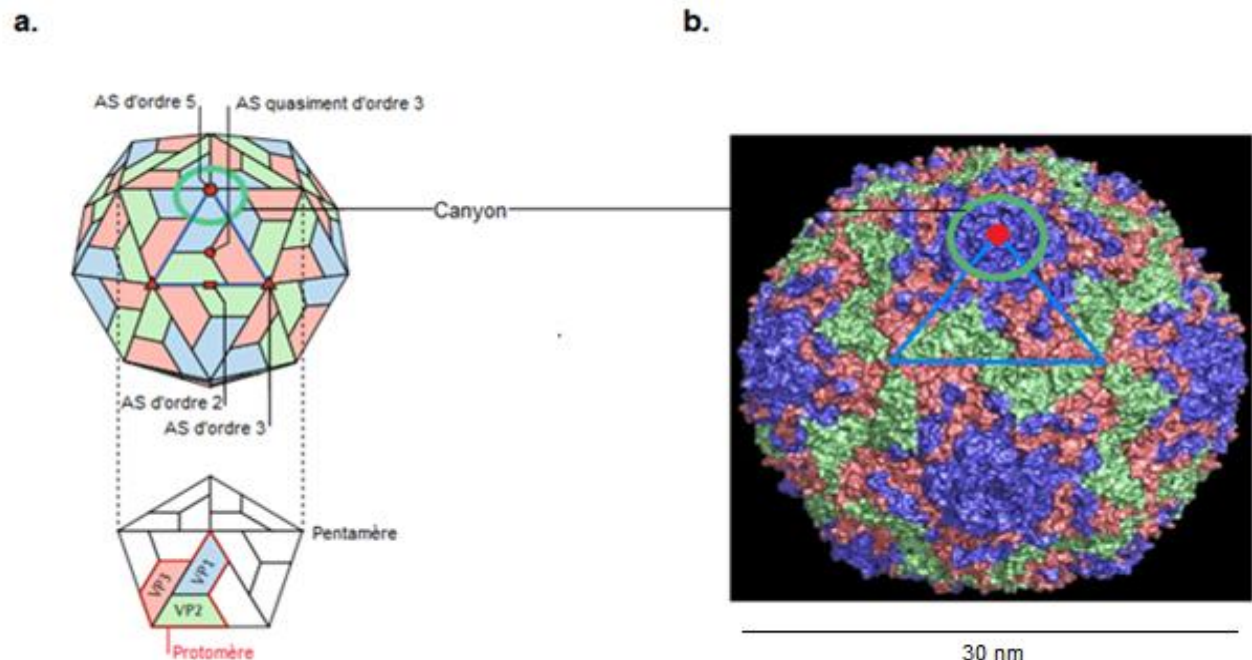
## 2.1.2.2. Structure

### 2.1.2.2.1. Morphologie

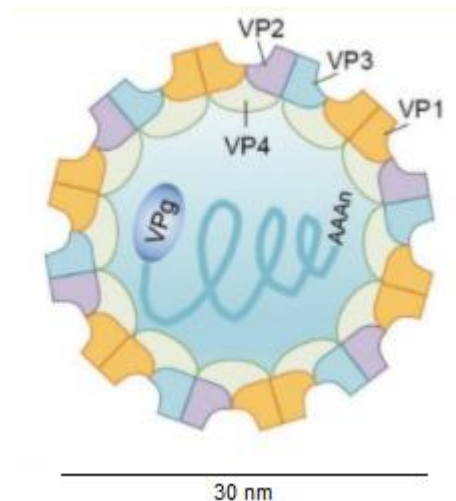
Virus de la famille des *Picornaviridae*, les entérovirus bovins sont des virus à ARN d'environ 30 nanomètres de diamètre, non enveloppés et constitués d'une capsidie protégeant le matériel génétique du virus. Cette capsidie icosaédrique est constituée de 60 protomères eux-mêmes constitués des quatre protéines structurales décrites dans les paragraphes précédents et rencontrées dans la quasi-totalité des genres de la famille : VP1, VP2, VP3 et VP4. Cinq de ces protomères forment un pentamère et la capsidie est composée de 12 pentamères. Cette disposition particulière des protéines fait apparaître des axes de symétrie (AS) au sein du virus qui sont d'ordre 2,3 et 5 (Figure 14).

Les protéines VP1, VP2 et VP3 se situent à la surface du virus et ont une structure secondaire identique en tonneau bêta, succession de huit feuillets bêta antiparallèles très répandue au sein de la famille des *Picornaviridae*. Ces particularités structurales entraînent la formation de « canyons » à la surface de la capsidie et autour de chaque axe de symétrie d'ordre 5, correspondant aux sites d'interaction du virus avec les cellules hôtes (Figure 14). La protéine VP4 quant à elle est une protéine myristoylée dans sa région N-terminale se situant à l'intérieur de la particule virale en interaction étroite avec le génome du virus. L'épaisseur de la capsidie est d'environ 5 nanomètres (Figure 15) (Baggen *et al.*, 2018).

**Figure 14 : Structure simplifiée d'un entérovirus (a.) comparée à l'ultrastructure du virus PS-87 (EV-F3) obtenue par cristallographie par rayons lasers à électrons libres émettant des rayons X (b.) (Roedig *et al.*, 2017 ; Baggen *et al.*, 2018)**

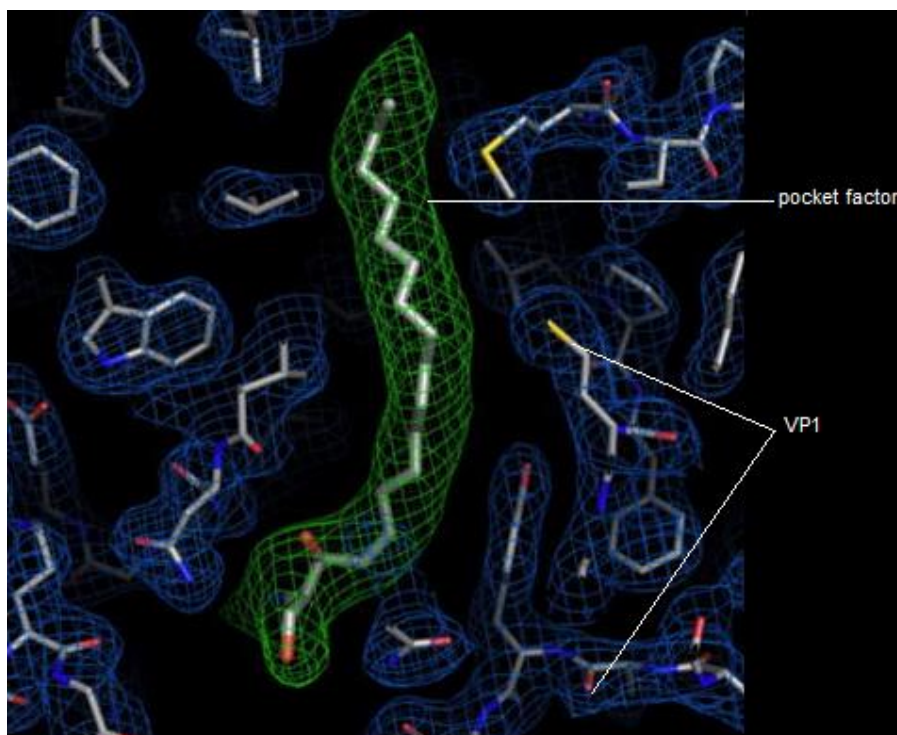


**Figure 15 : Coupe de la structure simplifiée d'un entérovirus (Yi *et al.*, 2017)**



Le fond de ces canyons est constitué d'une poche hydrophobe formée par la structure de la protéine VP1 et occupée par une substance lipidique constituée de différents acides gras dénommée « pocket factor » : celle-ci est impliquée dans la stabilisation de la structure du virus et joue un rôle fondamental dans son étape de décapsidation (Baggen *et al.*, 2018). Sa constitution chez les entérovirus bovins a été déterminée de façon précise par Smyth *et al.* en 2003 ; la figure 16 ci-dessous montre la répartition de la densité électronique au sein de cette poche avec d'une part le « pocket factor » représenté ici par une molécule de sphingosine associée à une modélisation de sa densité électronique (en vert) et d'autre part la poche formée par VP1 (en bleu) chez l'entérovirus bovin PS-87 (EV-F3).

**Figure 16 : Représentation des différentes densités électroniques au sein d'une poche hydrophobe de l'entérovirus PS-87 (EV-F3) à l'aide de la cristallographie par rayons lasers à électrons libres émettant des rayons X (Roedig *et al.*, 2017)**



#### 2.1.2.2. Structure génétique

À l'instar des virus de la famille des *Picornaviridae*, les entérovirus bovins possèdent un génome composé d'une molécule d'ARN monocaténaire linéaire non segmentée de polarité positive. Elle est constituée d'environ 7500 nucléotides qui codent les 4 protéines structurales citées précédemment mais aussi des protéines non-structurales essentielles à la réplication et à la traduction du génome (Figure 17). Ce génome est composé de deux régions non codantes entourant un cadre de lecture ouvert ou ORF (« *Open Reading Frame* ») :

- Une région non-codante en 5' (nommée 5'UTR pour « *Untranslated Transcribed Region* ») longue d'environ 820 nucléotides composée de 6 domaines formés par des replis particuliers de l'ARN en tige-boucle ; le premier de ces domaines, d'une longueur d'environ 100 nucléotides, a la particularité d'être dupliqué dans les deux espèces d'entérovirus bovins (Figure 18). Ce domaine est dit en feuille de trèfle ou « *cloverleaf* » et forme avec les cinq autres domaines le complexe IRES (« *Internal Ribosome Entry Site* ») : cette structure est fondamentale pour l'initiation de la traduction du génome avec l'implication des ribosomes cellulaires. Les domaines III et VI ont une taille et une forme propre aux entérovirus bovins. Cette région est également composée d'une petite protéine virale d'une vingtaine de nucléotides qui joue le rôle de l'habituelle coiffe que l'on retrouve au niveau des ARN messagers en région 5' dans les cellules eucaryotes : il s'agit de la protéine VPg (« *Viral Protein genome-linked* ») qui est aussi la protéine 3B obtenue après traduction (Figure 17) et qui joue le rôle d'amorce lors de la réplication du génome (Hughes et Ryan, 2008 ; Baggen *et al.*, 2018).
- Une région non-codante en 3' (nommée 3'UTR) longue d'environ 70 nucléotides également composée de deux replis en tige-boucle et se terminant par une queue polyadénylée ou queue poly-A de longueur variable. Cette région, par le biais d'éléments cis-régulateurs, interagit avec la région 5'UTR lors de l'initiation de la réplication (*cf infra*) (Hughes et Ryan, 2008)
- Une région codante d'environ 6500 nucléotides correspondant au cadre de lecture et traduite dans un premier temps en une polyprotéine d'environ 2200 acides aminés elle-même divisée en trois protéines : P1, P2 et P3. Différentes protéases vont ensuite agir pour former les quatre protéines structurales issues de P1 et les sept protéines non structurales issues de P2 et P3 : 2A<sup>pro</sup>, 2B, 2C, 3A, 3B=VPg, 3C<sup>pro</sup> et 3D<sup>pol</sup>(ARN polymérase) (Figure 17) (Hughes et Ryan, 2008)

Une étude très récente (Lulla *et al.*, 2019) a montré qu'il existait une autre région codante dans le génome des entérovirus située au niveau du domaine VI dénommée uORF (« *upstream Open Reading Frame* ») (Figure 19) : cette région codant une protéine de 67 acides aminés nommée UP serait notamment impliquée dans le caractère pathogène des virus en déstabilisant les membranes cellulaires ; elle est particulièrement présente dans les espèces des entérovirus bovins (*Enterovirus E* et *F*).



Figure 17 : Détail de la structure du génome des entérovirus et des protéines issues de l'expression de ce génome (Yi *et al.*, 2017)

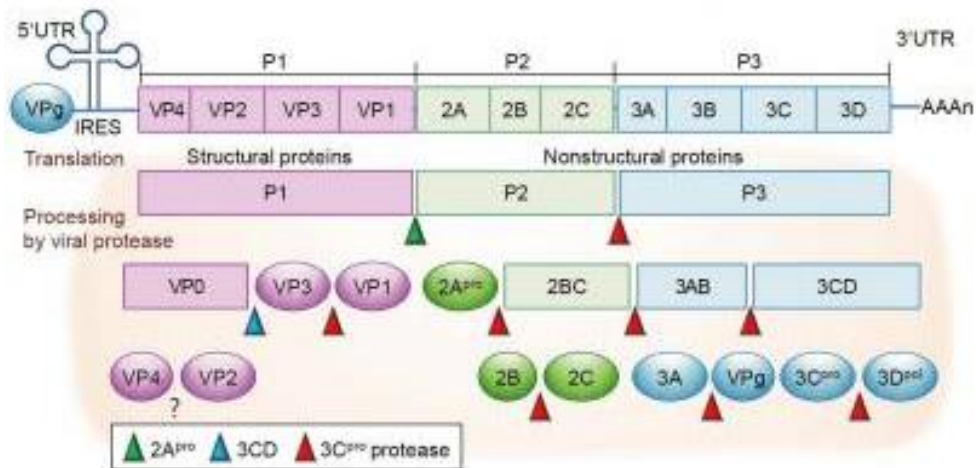


Figure 18 : Structure détaillée de la région non-codante en 5' (5'UTR) dite en feuille de trèfle des entérovirus bovins (complexe IRES) (Hughes et Ryan, 2008)

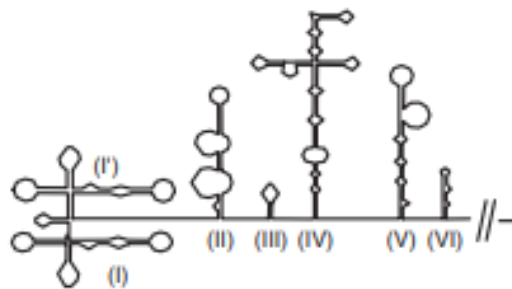
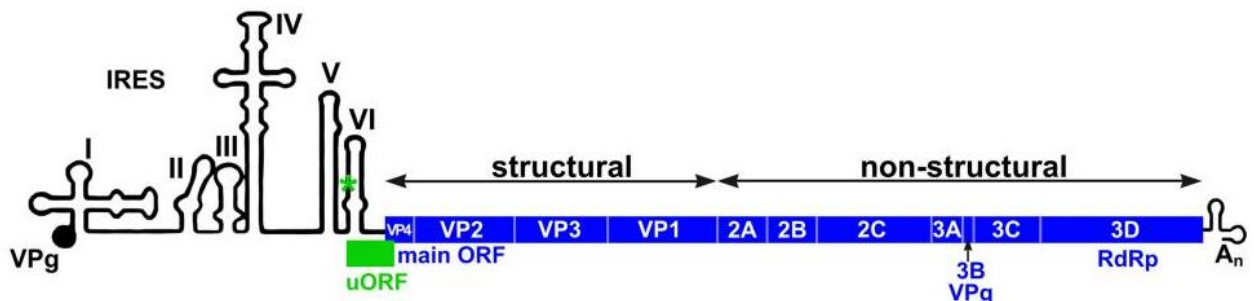


Figure 19 : Insertion de la région codante supplémentaire (uORF) sur le génome des entérovirus (Lulla *et al.*, 2019)



### 2.1.2.3. Propriétés physico-chimiques

Les entérovirus bovins tout comme la grande majorité des virus du genre *Enterovirus* sont très résistants dans les milieux dont le pH est très bas ce qui explique leur résistance dans l'estomac, mais aussi à différents produits chimiques tels que l'alcool à 70°, l'éther, le chloroforme ou encore le désoxycholate de sodium. Ces virus résistent quelques semaines dans l'environnement et peuvent survivre des années à -20°C. Ils sont cependant thermolabiles à 60°C et sensibles au formol, au bêta-propionolactone, au glutaraldéhyde, à l'hypochlorite de sodium et aux UV. Le tableau 10 montre qu'à partir de 60°C, le virus HY12, entérovirus bovin du sérotype EV-E3, est détruit mais qu'il résiste à un pH descendant jusque 3. En effet, le calcul de la TCID<sub>50</sub> (Fifty percent Tissue Culture Infective Dose) correspondant à la dose virale permettant d'infecter 50 % des cellules cultivées est calculée pour ce virus : elle est de 10<sup>-11,68</sup> pour 0,01 mL. Ensuite, celle-ci est calculée de la même façon mais dans des situations particulières (traitements chimiques et thermiques notamment) : lorsque la TCID<sub>50</sub> a une valeur très augmentée (jusqu'à 10<sup>-0,0</sup>), cela signifie qu'il n'y a plus assez de virus capable d'induire un effet cytopathique sur au moins 50 % de cellules : le virus est donc détruit par le traitement chimique ou thermique utilisé (Koike *et al.*, 1990 ; Chambon *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2014).

Cette capacité à résister de longues périodes dans l'environnement permet leur utilisation en tant que marqueurs de la contamination fécale par les cheptels bovins dans des zones spécifiques (Ley *et al.*, 2002).

**Tableau 10 : Propriétés du virus HY12, entérovirus bovin du sérotype EV-E3 en fonction des variations du milieu (Zhu *et al.*, 2014)**

Traitement		Groupe traité (TCID <sub>50</sub> pour 0,01 mL)	Groupe non traité (TCID <sub>50</sub> pour 0,01 mL)
Chloroforme		10 <sup>-10,1</sup>	10 <sup>-10,7</sup>
Ether		10 <sup>-10,0</sup>	10 <sup>-10,2</sup>
Test de résistance à la chaleur (Durée de contact : une heure)	50 °C	10 <sup>-8,4</sup>	10 <sup>-10,7</sup>
	60 °C	10 <sup>-0,0</sup>	10 <sup>-10,0</sup>
	70 °C	10 <sup>-0,0</sup>	10 <sup>-10,4</sup>
	80 °C	10 <sup>-0,0</sup>	10 <sup>-10,5</sup>
Résistance en milieu acide (pH)	5,0	10 <sup>-8,8</sup>	10 <sup>-9,6</sup>
	3,0	10 <sup>-9,1</sup>	10 <sup>-10,4</sup>

### 2.1.3. Présentation des entérovirus bovins : bilan

- Les entérovirus bovins font partie du genre *Enterovirus* de la famille des *Picornaviridae* ; cette famille est composée de plus de 63 genres affectant les cinq grandes classes de vertébrés et sont retrouvés dans le monde entier. Le classement d'un virus nouvellement découvert dans ces genres se fait exclusivement sur la base de leur structure génétique.
- Les entérovirus bovins sont classés dans deux espèces du genre *Enterovirus* : *Enterovirus E* et *Enterovirus F* comprenant respectivement cinq et sept sérotypes différents à ce jour ; ils touchent essentiellement les bovins mais ont été retrouvés chez d'autres espèces comme les opossums ou les dauphins. La découverte de ces sérotypes a été permise par le développement des nouvelles techniques d'identification comme le séquençage nouvelle génération.
- Les entérovirus bovins sont des virus de forme icosaédrique non enveloppés d'environ 30 nanomètres de diamètre et dont le matériel génétique est constitué d'un unique brin d'ARN de polarité positive ; la traduction de ce brin permet la formation de protéines structurales impliquée dans la structure des particules virales et des protéines non structurales impliquées dans la réplication du matériel génétique.
- La structure des entérovirus bovins, typique de la famille des *Picornaviridae*, leur confère une résistance à de nombreux détergents et aux milieux acides. Ils ne peuvent néanmoins pas survivre à des températures supérieures à 60 °C.



## 2.2. Physiopathologie

### 2.2.1. Généralités et voies de contamination

La physiopathologie des infections aux entérovirus bovins est quasiment inconnue à ce jour. En effet, on sait que comme pour les autres espèces d'entérovirus, la contamination se fait majoritairement par voie orale mais aussi par le biais des aérosols. Ainsi, grâce à leur résistance à des pH très bas, ces virus sont capables de parvenir dans les intestins sans être détruits par l'acidité gastrique. Il s'en suit une contamination des cellules épithéliales intestinales et l'utilisation de la machinerie cellulaire permettant la formation des particules virales ensuite excrétées dans le tractus digestif. Cependant, d'autres voies de contamination sont possibles notamment la contamination *in-utero* : très récemment, la présence d'anticorps dirigés contre un entérovirus bovin du sérotype EV-E1 a été mise en évidence chez des veaux n'ayant pas encore pris leur colostrum ce qui montre que le virus passe la barrière placentaire puisque ces anticorps ne peuvent pas être issus de la mère en raison de la placentation épithélio-choriale. De plus l'infection peut avoir lieu à n'importe quel moment de la gestation (Birdane et Gür, 2019).

Une seule étude à ce jour (Blas-Machado *et al.*, 2011) s'est intéressée à la pathogénicité des entérovirus bovins avec l'exemple d'un entérovirus du sérotype EV-E1 découvert en Oklahoma en 2007 sur une vache de race Aberdeen-Angus, cultivé et inoculé par voie intranasale à 18 veaux de deux à trois mois d'âge sans antécédents. Cette étude met en évidence à l'examen *post-mortem* de ces veaux la présence du virus par PCR au niveau de la partie terminale de l'iléon, du caecum et de l'anse spirale du colon ascendant sur la majorité des veaux infectés. Le virus a également été retrouvé dans l'encéphale d'un veau infecté et dans le cœur d'un autre veau infecté, et ce quelques jours seulement après l'inoculation. Il en est donc conclu que les points d'entrée majeurs de ce virus dans l'organisme sont bien les cellules épithéliales du tractus digestif avec une dissémination par la suite dans les nœuds lymphatiques et les autres organes de l'organisme.

### 2.2.2. Cycle viral

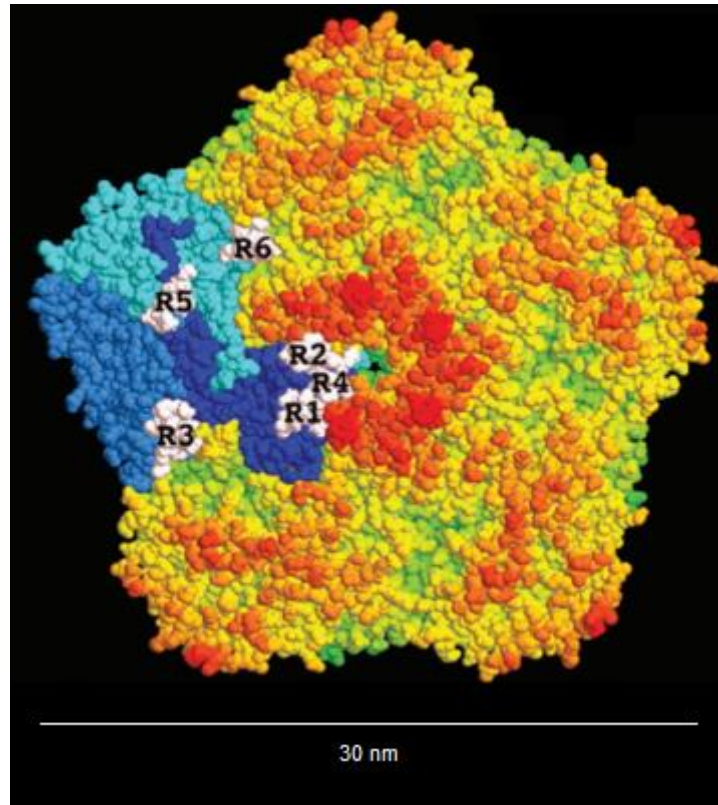
Aucune étude ne s'est particulièrement intéressée sur le cycle des entérovirus bovins au sein des organismes. Cependant les cycles viraux des entérovirus touchant particulièrement l'Homme sont décrits avec précision dans la littérature et permettent une description de celui des entérovirus bovins par analogie.

Après être parvenu au niveau de la muqueuse intestinale, le virus va se fixer à des récepteurs cellulaires membranaires qui vont être essentiels dans la spécificité d'hôte et dans les maladies provoquées par le virus après l'infection. De plus, les entérovirus ne se fixent pas tous de la même manière : dans le cas des entérovirus bovins, deux sites de fixation sont privilégiés :

- Un site principal situé au bord du « canyon » composé de 5 parties (R1-R5) qui sont elles-mêmes des fragments de la protéine structurale VP1 (Figure 20)
- Un site plus petit situé à la base du « canyon » constitué de R6, fragment de la protéine structurale VP3 (Figure 20)

Ces 6 fragments diffèrent fortement par rapport aux autres entérovirus mais aussi entre les deux espèces d'entérovirus bovins, *Enterovirus E* et *Enterovirus F* (Goens *et al.*, 2004).

**Figure 20 : Représentation de la capside d'un virus de l'espèce *Enterovirus E* centrée sur un canyon : VP1 en bleu foncé, VP2 en bleu intermédiaire et VP3 en bleu clair (Goens *et al.*, 2004)**



Après s'être fixé à la cellule, le virus entre dans sa phase de décapsidation : le « pocket factor » présent dans le canyon est expulsé ce qui permet un changement de conformation du virus. Ensuite, la protéine VP1 subit des modifications dans sa partie N-terminale et la protéine VP4 est externalisée. Il en résulte la formation d'un pore membranaire permettant le relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule hôte. Une étude récente sur les entérovirus humains a montré d'une part que les modifications subies par la protéine VP1 consistent en la formation d'un pont entre VP1 et la membrane de la cellule hôte permettant l'ancrage du virus et d'autre part que la protéine VP4 externalisée forme le canal protéique au sein de la membrane cellulaire qui permet le passage du matériel génétique (Baggen *et al.*, 2018).

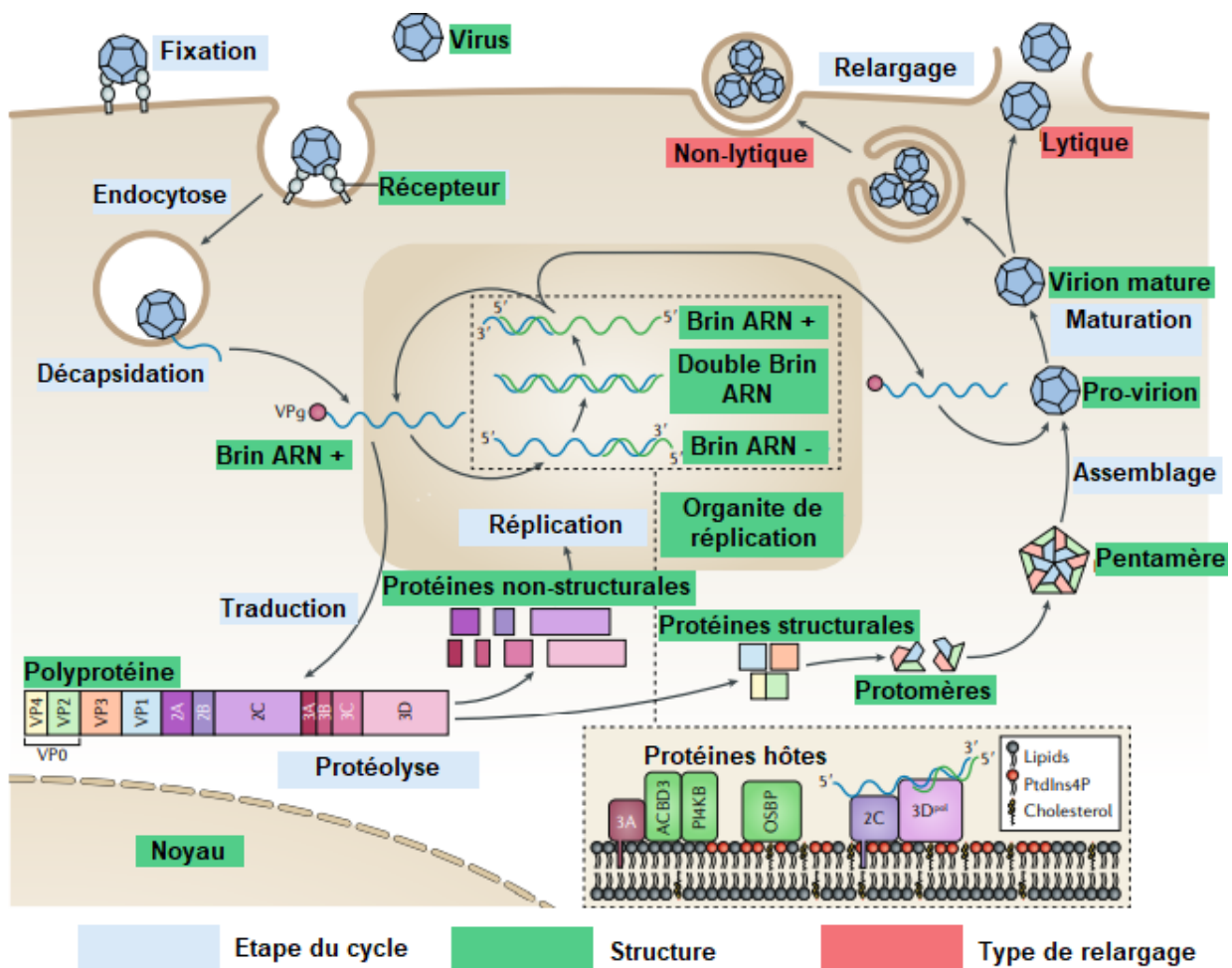
Ensuite, grâce à la protéine VPg (ou 3B) située au début de la région 5'UTR, la traduction du brin d'ARN peut avoir lieu : ainsi, l'ARN viral est considéré comme un ARN messenger et est traduit à l'aide du complexe IRES (Figure 18) qui permet le recrutement indispensable de la sous unité 40S du ribosome. Au terme de cette traduction, on retrouve la polyprotéine composée des trois polypeptides P1, P2 et P3 qui donnera après maturation et action de protéases virales (3C<sup>pro</sup> et 2A<sup>pro</sup>) les protéines virales structurales et non-structurales décrites dans les paragraphes précédents (Figure 17).

Il en découle d'une part la formation des capsides des nouvelles particules virales grâce aux protéines structurales et d'autre part le début de la réplication de l'ARN viral grâce aux protéines non-structurales, en particulier l'ARN polymérase (3D<sup>pol</sup>) : le brin d'ARN viral de polarité positive sert ainsi de matrice pour la copie d'un brin d'ARN de polarité négative (brin anti génomique) qui lui-même servira de matrice pour former plusieurs brins d'ARN de polarité positive. Ces brins nouvellement formés pourront soit rejoindre les capsides formées précédemment pour finalement former de nouvelles particules virales (pro-virions) soit être à leur tour copiés en d'autres brins d'ARN. Cette réplication a lieu dans une structure membranaire induite par l'infection virale issue de la cellule hôte permettant entre autre une protection de cette étape vis-à-vis des mécanismes de défense cellulaire : il s'agit de l'organite de réplication (Figure 21) (Baggen *et al.*, 2018).

De nombreux facteurs de régulation de la réplication intervenant dans ce cycle notamment la protéine virale 3CD essentielle à la réplication ont été mis en évidence dans les espèces d'entérovirus touchant l'Homme (Vogt et Andino, 2010) ce qui n'a pas été décrit chez les entérovirus bovins.

Le cycle se termine par la libération des particules virales matures néosynthétisées 6 à 8 heures après l'attachement cellulaire du virus. Pour les entérovirus bovins, le mécanisme de relargage des particules virales n'est pas connu, il pourrait être lytique ou non lytique (Figure 21).

**Figure 21 : Cycle viral schématisé d'un entérovirus dans une cellule humaine avec les détails du complexe de réplication (entre pointillés) (Baggen *et al.*, 2018)**



### 2.2.3. Excrétion virale

Dès que le cycle est terminé, les particules virales qui viennent de sortir des cellules vont soit être excrétées dans les selles soit gagner le tissu lymphoïde intestinal comme les nœuds lymphatiques mésentériques et les plaques de Peyer : il va s'en suivre une nouvelle réplication qui va induire une virémie ; le virus va ainsi gagner la plupart des organes de l'animal et provoquer les signes cliniques associés qui se développeront par la suite. Cette atteinte du tissu lymphoïde va également induire la production d'anticorps par stimulation du système immunitaire.

Le virus va donc être *in fine* excrété principalement dans les selles mais aussi dans les sécrétions nasales et buccales lors d'atteintes respiratoires d'où sa transmission possible par aérosol (Blas-Machado *et al.*, 2011 ; Birdane et Gür, 2019).

Yamada *et al.* (2020) ont montré dans une étude portant sur les virus marqueurs du niveau de biosécurité dans les élevages bovins que les entérovirus bovins étaient détectés par RT-PCR dans les selles des veaux jusqu'à 5 semaines après la première détection. Des études antérieures ont montré que l'excrétion dans les selles et dans les sécrétions nasales pouvait se faire jusqu'à treize mois après la disparition des signes cliniques (Knowles et Mann, 1990).

### 2.2.4. Immunité

Depuis leur découverte, il est établi que des anticorps dirigés contre les entérovirus bovins sont synthétisés par l'organisme. La séroconversion se fait environ 5 jours après l'entrée du virus dans l'organisme (Blas-Machado *et al.*, 2011). Aucune étude n'a cependant étudié l'immunité à moyen et long terme et les cas potentiels de réinfection.

### 2.2.5. Physiopathologie : bilan

- La physiopathologie des entérovirus bovins a été très peu étudiée et donc très peu connue aujourd'hui
- La voie d'entrée principale de ces virus est la voie orale par contamination oro-fécale et par le biais des aérosols ; des contaminations *in utero* ont également été constatées.
- Ces virus semblent avoir un tropisme particulier pour les entérocytes où ils vont pouvoir réaliser leur cycle après avoir résisté à l'acidité gastrique ; de nombreux mécanismes faisant intervenir la machinerie cellulaire permettent à la fois la formation de nouvelles structures virales mais aussi de nouveaux supports génétiques : de nouvelles particules virales infectantes sont émises dans le tractus digestif et peuvent rejoindre d'autres organes ou contaminer l'environnement du veau pendant plusieurs semaines.
- La réponse immunitaire induite par ces virus n'a jamais été précisément étudiée même si des anticorps dirigés contre ces entérovirus bovins seraient synthétisés cinq jours après l'entrée du virus dans l'organisme.

## 2.3. Épidémiologie et étude clinique

### 2.3.1. Prévalence et présentation

Les entérovirus bovins ont la particularité d'être présents dans les cheptels bovins avec une très grande prévalence et le plus souvent de façon asymptomatique. Cho *et al.* (2013) ont montré en recherchant différents agents pathogènes pouvant être responsables de diarrhées chez des veaux dans le Midwest des États-Unis que les entérovirus bovins étaient présents plus souvent dans les selles des veaux ne présentant pas de signes cliniques (32 % d'entre eux) que dans les selles des veaux présentant des diarrhées (5% d'entre eux). De plus, Ley *et al.* (2002) ont montré que 76 % des bovins sont porteurs d'entérovirus bovins, reflétant une présence omniprésente dans les élevages et dans le monde entier.

Ces virus ont cependant été retrouvés chez des bovins présentant des infections digestives et respiratoires et des troubles de la reproduction (infertilité, avortements) (*cf infra*) mais l'association entre la présence de ces virus et les signes cliniques des bovins infectés a rarement été établie de façon certaine ; en effet dans la plupart des études la présence d'autres agents pathogènes pouvant être responsables des signes cliniques constatés a soit été mise en évidence en même temps que les entérovirus bovins (co-infections) soit n'a pas été investiguée (Gomez et Weese, 2017).

Ainsi, les entérovirus bovins font partie des agents pathogènes potentiellement responsables de diarrhées pour lesquels les postulats de Koch sont très difficiles à appliquer ; le développement du séquençage nouvelle génération étend encore plus ces difficultés d'où la nécessité pour certains auteurs d'une modification profonde de ces principes (*cf § 1.2.1.*).

Enfin, les signes cliniques présentés par les bovins infectés par les entérovirus bovins ne sont pas spécifiques et sont très rarement détaillés dans les études.

### 2.3.2. Signes cliniques

#### 2.3.2.1. Signes digestifs

Les entérovirus bovins sont retrouvés dans les selles de bovins souffrant de diarrhées, d'hyperthermie sévère avec des températures corporelles atteignant 41°C voire de coliques et de méléna dans les cas les plus graves. Les très jeunes bovins avec un âge variant d'un à quatre mois sont particulièrement touchés par ces formes digestives avec une très forte morbidité mais une très faible mortalité (Candido *et al.*, 2019). Néanmoins la présence d'un entérovirus bovin a été constatée dans un cas d'entérite ulcéraire fatale chez une vache gestante de deux ans qui présentait de la diarrhée associée à du méléna et de l'hyperthermie (Moll et Finlayson, 1957 ; Blas-Machado *et al.*, 2007 ; He *et al.*, 2017 ; Beato *et al.*, 2018).

### **2.3.2.2. Signes respiratoires**

La présence de ces virus a également été mise en évidence chez des bovins atteints de signes respiratoires associés là aussi à de l'hyperthermie marquée : le signe le plus fréquent est un écoulement nasal mais une légère toux a également été constatée chez des veaux ayant entre trois et six mois d'âge. Les jeunes bovins sont également les plus atteints (entre un mois et six mois d'âge) mais des cas d'affections respiratoires chez des vaches adultes ont également été constatés (Moll et Finlayson, 1957 ; Blas-Machado *et al.*, 2011 ; Beato *et al.*, 2018).

### **2.3.2.3. Troubles de la reproduction**

Les entérovirus bovins sont également souvent retrouvés chez des vaches présentant des troubles de la reproduction : on retrouve de l'infertilité, des avortements, des naissances prématurées et des malformations. La mortalité embryonnaire constatée lors de ces infections résulte très souvent de l'infection du fœtus lui-même mais son immunocompétence permet parfois sa survie (Moll et Finlayson, 1957 ; Zhang *et al.*, 2014 ; Birdane et Gür, 2019).

### **2.3.2.4. Autres manifestations cliniques**

Un cas d'atteinte génitale chez un taureau a été mis en évidence à ce jour : celui-ci présentait une absence de spermatogénèse, une orchite associée à une atrophie des testicules et une baisse de libido. Un virus de l'espèce *Enterovirus E* a été retrouvé dans son liquide séminal (Weldon *et al.*, 1979).

## **2.3.3. Épidémiologie et étude clinique : bilan**

- Les entérovirus bovins sont essentiellement retrouvés chez des veaux de plus d'un mois mais aussi chez des bovins adultes ; ils sont également omniprésents dans l'environnement, faisant d'eux des marqueurs de contamination fécale.
- Les entérovirus bovins sont très souvent identifiés chez des bovins qui ne présentent aucun symptôme, et même plus fréquemment que chez ceux qui en présentent : les postulats de Koch sont donc très difficiles à appliquer pour ces virus.
- Néanmoins, quelques cas d'infection aux entérovirus bovins ont été répertoriés et ces derniers pourraient être responsables de signes digestifs et respiratoires et de troubles de la reproduction ; ces signes sont toutefois très généraux et donc difficilement imputables aux seuls entérovirus bovins.

## 2.4. Diagnostic

### 2.4.1. Diagnostic différentiel

Comme nous l'avons vu précédemment, les entérovirus bovins sont responsables de signes cliniques très généraux qui ne permettent pas de les discriminer d'autres agents pathogènes responsables de signes très similaires voire identiques (*cf* § 1.). Il est donc impossible d'établir un diagnostic de certitude sur la base des seuls signes cliniques rencontrés.

### 2.4.2. Prélèvements

Les entérovirus bovins peuvent être retrouvés dans quasiment tout l'organisme du bovin lors de son infection : ils sont retrouvés dans les fluides corporels (liquide séminal, sécrétions vaginales, sang, salive, écoulements nasaux, liquide amniotique), dans la plupart des organes (nœuds lymphatiques, foie, poumons, pancréas, intestin grêle, caecum, abomasum, colon, rate, reins, placenta) mais aussi et surtout dans les selles, prélèvement le plus utilisé pour l'étude des entérovirus bovins.

La recherche indirecte des entérovirus notamment pour des analyses sérologiques se fait essentiellement dans le sang.

La présence de ces virus peut également être mise en évidence de façon indirecte dans des prélèvements environnementaux (eaux usées, eau de rivière) : cela a permis à plusieurs études récentes de considérer les entérovirus bovins comme de très bons marqueurs de la contamination environnementale par les animaux de rente (Yamada *et al.*, 2020 ; Rahmani *et al.*, 2020)

### 2.4.3. Méthodes diagnostiques directes

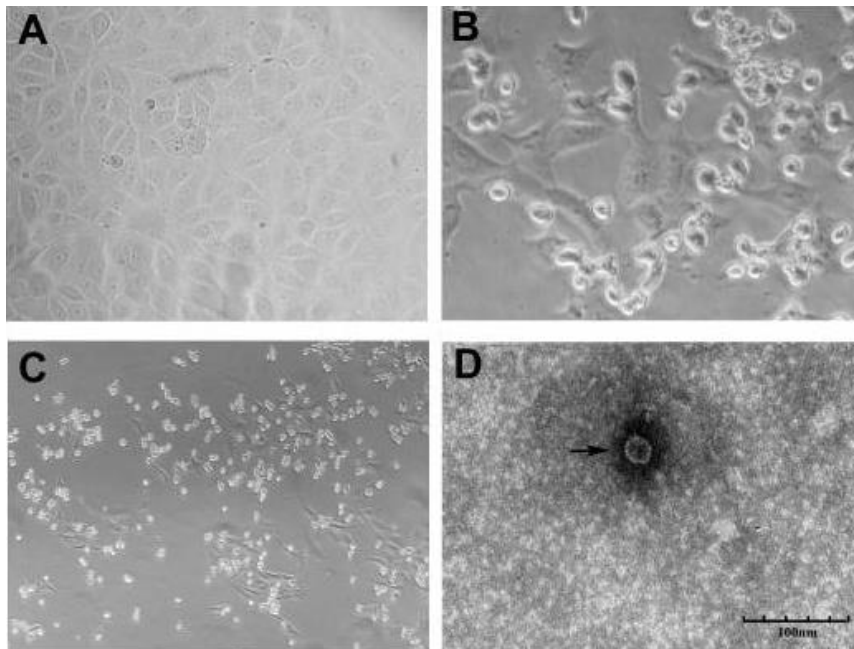
#### 2.4.3.1. Isolement viral

Le genre *Enterovirus* est composé de virus qui sont très reconnaissables par leurs actions sur les cellules qu'ils infectent et notamment sur l'organisation de celles-ci : il s'agit de leur effet cytopathique ou ECP. Celui-ci permet une forte suspicion de leur présence dans un échantillon sans avoir recours à des techniques d'identification plus élaborées. La recherche de cet effet particulier se fait couramment sur des lignées de cellules Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) préalablement cultivées en laboratoire. L'effet cytopathique du genre *Enterovirus* se caractérise par un arrondissement des cellules associé à un détachement par petits groupes cellulaires. Il a permis la découverte du premier entérovirus bovin (Moll et Finlayson, 1957) et a été largement utilisé dans les études qui suivirent sur ce sujet.

La figure 22 présente par exemple l'effet cytopathique du virus HY12, entérovirus bovin appartenant au sérotype EV-E3 cultivé sur des lignées de cellules MDBK (A constitue le témoin) : l'effet cytopathique apparaît entre 6 et 8 heures après l'inoculation sur les cellules MDBK, les cellules commencent à s'arrondir et à s'individualiser (Figure 22B). Entre 24 et 48 h après l'infection, la majorité des cellules se détachent les unes des autres (Figure 22C). Une particule virale du virus d'une vingtaine de nanomètres est observée par microscopie électronique au milieu des cellules (Figure 22D) (Zhu *et al.*, 2014).

Il peut arriver dans certains cas que la charge virale ne soit pas suffisante et qu'aucun effet cytopathique ne soit observé après quatre ou cinq jours de culture ; dans ce cas, un deuxième voire un troisième passage est effectué sur cellules pour s'assurer de la présence du virus dans le prélèvement.

**Figure 22 : Effet cytopathique (ECP) du virus HY12 (EV-E3) sur des lignées de cellules MDBK (Zhu *et al.*, 2014)**



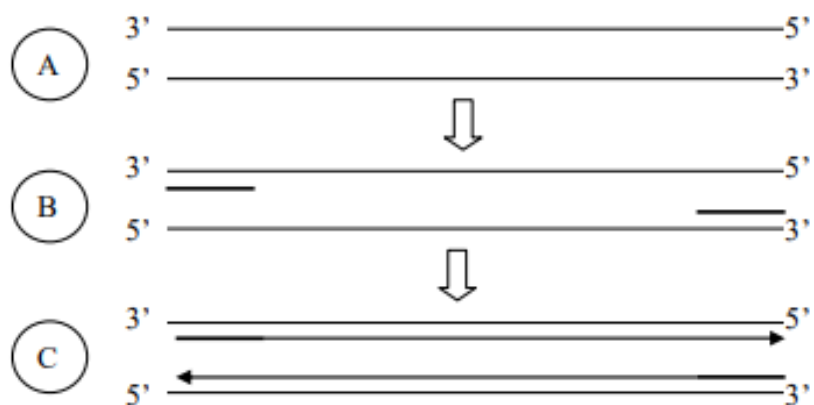
Cet effet particulier qu'ont les entérovirus bovins sur les cellules constitue le point de départ de l'étude que nous analyserons dans la suite de ce travail.

#### **2.4.3.2. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)**

La RT-PCR est la technique de choix pour détecter les entérovirus bovins dans un échantillon puisque leur matériel génétique est constitué d'un brin d'ARN. Cette méthode diagnostique consiste en une rétrotranscription de l'ARN viral en un brin d'ADN complémentaire plus stable (ADNc) qui va lui-même subir une étape de PCR classique à l'aide d'amorces spécifiques et d'une enzyme : la Taq polymérase ; les deux brins d'ADN vont se séparer, des sondes vont ensuite s'hybrider spécifiquement sur chaque brin et chaque brin va ensuite subir une élongation par action de la Taq polymérase pour ainsi former deux molécules double brin (Figure 23).



**Figure 23 : Étapes de la PCR (Gillier, 2013)**



Légende : A : séparation des brins

B : hybridation des amorces

C : élongation du brin complémentaire par la Taq polymérase

Les sondes utilisées dans l'étape de rétrotranscription peuvent être :

- Des oligonucléotides dT qui se fixent sur la queue polyadénylée des ARN viraux
- Des amorces aléatoires qui amplifient des ADNc de grande taille sous forme de fragments
- Des amorces spécifiques de la séquence que l'on souhaite transformer en ADNc.

Dans la plupart des études où les entérovirus bovins ont été identifiés, les amorces utilisées sont des amorces aléatoires lorsque la nature du virus n'est pas connue avant cette étape (Candido *et al.*, 2019) ou bien des amorces spécifiques correspondant le plus souvent à des fragments de matériel génétique d'entérovirus bovins déjà séquencés (Jiménez-Clavero *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2014) ; l'utilisation de ces amorces spécifiques donne de meilleurs résultats car les amorces aléatoires ont tendance à permettre l'amplification d'autres ARN parasites présents dans l'échantillon qui peuvent fausser le résultat final.

La RT-PCR en temps réel, technique plus récente, permet une quantification indirecte de l'ARN présent dans l'échantillon par l'évaluation du nombre de copies d'ADN formées après PCR ; Zhu *et al.* (2015) ont étudié la détection d'entérovirus bovins grâce à cette technique à laquelle est couplée une réaction d'immunofluorescence par l'utilisation d'une molécule spécifique : SYBR Green I. Il s'agit d'un composé organique capable d'émettre une fluorescence lors de sa fixation aux acides nucléiques. L'intensité de cette fluorescence est maximale lorsque le double brin d'ADN est complètement synthétisé. L'étude, par comparaison avec la technique de RT-PCR classique, montre que la RT-PCR en temps réel utilisant SYBR Green I est plus spécifique et plus sensible.

### 2.4.3.3. Séquençage nouvelle génération

Le séquençage nouvelle génération (NGS) est mis en œuvre à partir de 2007 ; il s'agit en réalité d'un séquençage de deuxième génération pour contraster avec le séquençage de première génération qui n'est autre que la méthode de Sanger utilisée depuis 1977. Son intérêt majeur est l'analyse synchrone de millions voire de milliards de fragments d'ADN, synonyme d'une baisse de coût et d'une rapidité de séquençage largement supérieure à la méthode de Sanger (Ilie *et al.*, 2014). Cette technologie, réservée initialement aux principaux secteurs de recherche, tend à se démocratiser et est de plus en plus abordable depuis le développement de machines plus compactes et dont le fonctionnement est simplifié. Depuis 2007, d'autres types de séquençage nouvelle génération ont vu le jour (séquençage de troisième et de quatrième génération) permettant l'analyse de fragments d'ADN beaucoup plus longs en comparaison avec les séquençages de deuxième génération.

#### 2.4.3.3.1. Exemple de la technologie Illumina®

Ces séquençages diffèrent d'une génération à l'autre : voici l'exemple du séquençage de deuxième génération utilisant la technologie Illumina®, largement répandue aujourd'hui et utilisée dans l'étude analysée dans la partie expérimentale de ce travail (Figure 24) : pour cette technologie, l'amplification de l'échantillon à analyser s'effectue sur un support solide. La réaction de séquençage est alors réalisée directement sur le support où l'ADN a été amplifié par techniques de PCR. Elle se déroule position après position et après ajout d'un mélange contenant toutes les bases associées chacune à un fluorophore différent. L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation. Un laser détecte les bases incorporées au fur et à mesure. Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante. La lecture est effectuée ainsi cycle après cycle. Cette méthode permet l'acquisition en parallèle de plus de 3 milliards de séquences de 150 paires de bases (Ilie *et al.*, 2014). L'utilisation par la suite d'un logiciel de traitement des données bio-informatiques débouche sur le séquençage des fragments ainsi analysés.

**Figure 24 : Caractéristiques de la plateforme MiSeq utilisant la technologie Illumina® (Ilie *et al.*, 2014)**

Société	
Plateforme	MiSeq
Méthode d'amplification	PCR en « pont » 
Méthode de séquençage	Synthèse
Durée de séquençage/run	26 heures
Capacité (Mb) séquençage/run	1500
Taille moyenne amplicons (pb)	150
Coût (€)/run	550
Coût appareil + annexe (k€)	100

#### 2.4.3.3.2. Application aux entérovirus bovins

Cette technologie a permis depuis une dizaine d'année une explosion du nombre d'entérovirus bovins découverts ; elle est à l'origine de la restructuration récente du genre *Enterovirus* : l'entérovirus bovin AN12 du sérotype EV-F7 a été séquencé et donc classé grâce à la technologie Illumina® qui a mis en évidence une grosse divergence structurale de ce virus par rapport aux autres virus du même sérotype (Tsuchiaka *et al.*, 2017). Beaucoup d'autres entérovirus bovins ont été séquencés aux quatre coins du globe grâce au séquençage nouvelle génération.

Beato *et al.* (2018) ont réalisé le séquençage d'un virus appartenant à l'espèce *Enterovirus E* en utilisant un couplage de séquençage nouvelle génération : un séquençage de deuxième génération (Plateforme NextSeq 500 (technologie Illumina®)) et un séquençage de quatrième génération (Plateforme MinION). Ce couplage a permis l'identification du virus en seulement 20 minutes et son séquençage complet en quelques heures. Cette étude insiste sur le fait que les entérovirus peuvent être identifiés très rapidement sans préparation fastidieuse en laboratoire et en économisant beaucoup de temps ; le séquençage de quatrième génération, plus récent, est également plus facile d'utilisation que les précédents et permet d'analyser des fragments d'ADN d'une très grande taille en comparaison avec celui de deuxième génération ce qui réduit le nombre d'étapes.

### 2.4.4. Méthodes diagnostiques indirectes

Les méthodes de diagnostic indirectes sont beaucoup moins utilisées que les méthodes de diagnostic directes dans le cas des entérovirus bovins. Plusieurs tests communs à de nombreux agents pathogènes peuvent être utilisés tels que la séroneutralisation, l'hémagglutination passive, le test de fixation du complément et le test ELISA.

#### 2.4.4.1. Séroneutralisation

Jusque dans les années 1990, la technique indirecte la plus répandue était la séroneutralisation : celle-ci consiste à mettre le sérum de l'animal à tester en contact avec une quantité de virus bien précise. Le mélange est ensuite inoculé à des cellules qui sont mises en culture pendant deux à cinq jours : si un effet cytopathique est retrouvé après l'incubation alors les anticorps dirigés contre les entérovirus bovins n'étaient pas présents dans le sérum. À l'inverse, l'absence d'effet cytopathique montre leur présence. Il s'agit encore aujourd'hui d'une technique de référence qui est très contraignante par sa durée de mise en œuvre et son coût élevé.

La séroneutralisation a notamment été utilisée à plusieurs reprises pour construire une classification des entérovirus bovins (Dunne *et al.*, 1974 ; Knowles et Barnett, 1985)

Cette technique a également mis en évidence des réactions immunitaires croisées entre les entérovirus bovins et le virus de la fièvre aphteuse, deux virus de la famille des *Picornaviridae* présentant un épitope en commun, compliquant l'éradication de la fièvre aphteuse (Andersen, 1978).

#### **2.4.4.2. Hémagglutination passive et test de fixation du complément**

L'hémagglutination passive consiste à mettre en contact le sérum du bovin à tester avec des hématies de moutons ou de cochons d'Inde présentant à leur surface des antigènes spécifiques des entérovirus bovins. Si le sérum contient des anticorps dirigés contre ces antigènes, une agglutination des hématies sera observée.

Le test de fixation du complément fait intervenir le système du complément constitué de protéines sériques qui réagissent avec les complexes antigène-anticorps. Le sérum du bovin à tester est chauffé de telle sorte que toutes les protéines du complément soient détruites sans détruire les anticorps présents, plus résistants à une augmentation de température. Une quantité connue de protéines du système du complément est incorporée au sérum ainsi que l'antigène spécifique des entérovirus bovins. La dernière étape consiste en l'incorporation de globules rouges généralement de moutons présentant des anticorps anti-globules rouges de moutons à leur surface. Si les anticorps dirigés contre les entérovirus bovins sont présents dans le sérum, ils vont se fixer à l'antigène présent dans le mélange formant ainsi des complexes anticorps-antigène. Les protéines du système du complément vont alors se fixer à ces complexes et seront épuisées dans le mélange. De ce fait, lorsque les globules rouges sont introduits, il n'y a plus de protéines dans le mélange qui pourront réagir avec les complexes anticorps-globules rouge laissant les globules rouges intacts. À l'inverse, si les anticorps dirigés contre les entérovirus bovins ne sont pas présents, les protéines du système du complément ne seront pas épuisées et les globules rouges seront donc lysés : le test est négatif si une solution rosée apparaît (Regalla, 1995).

Ces techniques ne sont plus utilisées aujourd'hui pour mettre en évidence le passage d'entérovirus bovins dans l'organisme ; elles ont toutefois aussi servi à établir une classification sérologique de ces virus (Knowles et Barnett, 1985).

#### **2.4.4.3. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

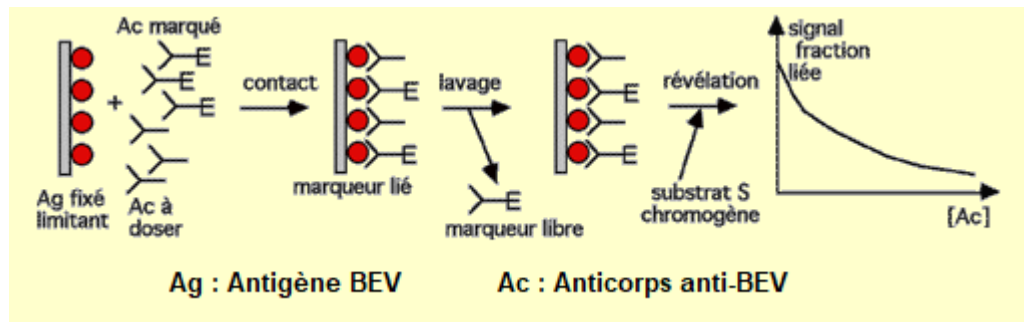
Différents tests ELISA ont été développés pour la détection des anticorps dirigés contre les entérovirus bovins dans les années 1990 se révélant beaucoup plus rapides, moins coûteux et plus sensibles que les tests de séroneutralisation (Zhang *et al.*, 1990 ; Höfner *et al.*, 1993)

Deux types de test ELISA concernant les entérovirus bovins sont rapportés :

##### *2.4.4.3.1. Test ELISA par compétition*

Des antigènes spécifiques d'entérovirus bovins sont fixés sur une plaque et mis au contact du sérum à tester mais aussi d'une quantité connue d'anticorps dirigés contre cet antigène conjugués à une enzyme. On effectue un rinçage puis on ajoute l'enzyme chromogène (substrat S de la figure 25) qui correspond à l'enzyme fixée sur les anticorps. On effectue ensuite la lecture par spectrophotométrie : la quantité d'anticorps non connue c'est-à-dire la quantité présente dans le sérum est inversement proportionnelle à la densité optique induite par l'immunofluorescence (Figure 25). Zhang *et al.* (1990) sont les premiers à avoir mis en place ce type de test ELISA pour la recherche des entérovirus bovins.

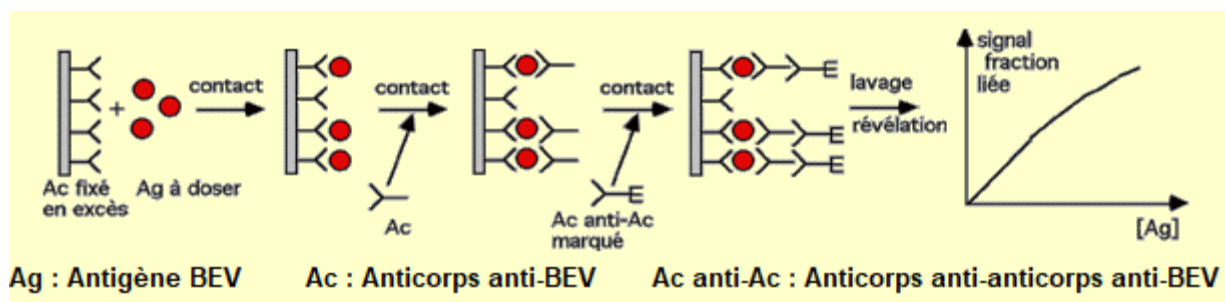
**Figure 25 : Principe du test ELISA par compétition pour le dosage d'anticorps (Lafont, 2021)**



#### 2.4.4.3.2. Test ELISA indirect en « sandwich »

Ce test fut utilisé indirectement par Höfner *et al.* (1993) pour prouver que les différents sérotypes d'entérovirus étaient beaucoup plus différenciables par cette technique que par le test de fixation du complément. Il consiste à fixer des anticorps dirigés contre un entérovirus bovin sur une plaque puis d'y mettre en contact des antigènes spécifiques de ce virus. D'autres anticorps dirigés contre ce même entérovirus sont ajoutés à la plaque : ceux-ci vont également se fixer aux antigènes déjà fixés aux anticorps de la plaque ; enfin des anticorps, sur lesquels sont fixés des enzymes, dirigés contre ces mêmes anticorps sont ajoutés au mélange. Après plusieurs lavages et la mise en contact d'une enzyme chromogène, la densité optique est évaluable par spectrophotométrie (Figure 26).

**Figure 26 : Principe du test ELISA indirect en « sandwich » (Lafont, 2021)**



En ce qui concerne les entérovirus bovins, les méthodes diagnostiques directes sont largement plus employées que les méthodes diagnostiques indirectes notamment du fait du développement du séquençage nouvelle génération ces dernières années. Le diagnostic classique passe encore aujourd'hui par l'isolement cellulaire qui amène à une forte suspicion d'infection par des entérovirus bovins ; celui-ci est, dans la grande majorité des études récentes, couplé au séquençage nouvelle génération et/ou à la RT-PCR en temps réel.

### 2.4.5. Diagnostic : bilan

- Lors d'une infection, les entérovirus bovins sont essentiellement recherchés dans les selles et dans le sang de façon directe et indirecte, ils peuvent cependant être retrouvés dans la plupart des organes de l'organisme du bovin atteint.
- Les méthodes de diagnostic directes sont les plus utilisées dans le cadre d'une infection par les entérovirus bovins : l'isolement viral avec mise en évidence d'un effet cytopathique reste le test de référence mais les techniques de RT-PCR et le séquençage nouvelle génération sont également utilisés très couramment.
- Les méthodes de diagnostic indirectes, historiquement très utilisées pour l'étude de la nomenclature des entérovirus bovins, ne le sont quasiment plus aujourd'hui (séroneutralisation, hémagglutination passive, test de fixation du complément) mis à part les tests ELISA réalisables pour détecter la présence des entérovirus bovins

## 2.5. Prévention et traitement

### 2.5.1. Mesures hygiéniques

Takahashi *et al.* (2020) ont montré très récemment que l'amélioration des mesures d'hygiène dans une ferme bovine japonaise avait un impact majeur sur la pression infectieuse de quatre types de virus bovins (les rotavirus, les coronavirus, les entérovirus et les torovirus bovins) : En comparant les pourcentages de détection de ces virus dans les selles de veaux ayant moins de trois semaines d'âge et plus de trois semaines d'âge avant et après avoir mis en place un protocole drastique de lavage des bottes des personnes circulant dans l'élevage, ils en concluent que le pourcentage de détection des entérovirus bovins dans les selles est significativement réduit après la mise en place du protocole et ce dans les deux lots. Cette tendance est également constatée pour les trois autres types viraux pour les veaux de moins de trois semaines d'âge et pour les torovirus bovins chez les veaux de plus de trois mois. Ce phénomène a été observé toute l'année, quelle que soit la saison pour les entérovirus bovins ; les autres types viraux sont également concernés, surtout en automne et en hiver.

**Tableau 11 : Comparaison des pourcentages de détection de quatre virus bovins dont les entérovirus bovins chez deux lot de veaux de classe d'âge différente avant et après l'amélioration des mesures d'hygiène au sein d'un élevage japonais (Takahashi *et al.*, 2020)**

**\*\* signifie  $p < 0.01$**

Virus	Veaux de moins de trois semaines d'âge		Veaux de plus de trois semaines d'âge	
	Avant (256 veaux)	Après (198 veaux)	Avant (304 veaux)	Après (202 veaux)
Rotavirus	39,1	<b>22,7**</b>	13,8	10,4
Torovirus	8,2	<b>1,0**</b>	11,2	<b>4,0**</b>
Entérovirus	28,9	<b>8,6**</b>	56,6	<b>16,8**</b>
Coronavirus	23,4	<b>8,1**</b>	33,2	35,6

**Tableau 12 : Comparaison des pourcentages de détection de quatre virus bovins dont les entérovirus bovins chez 960 veaux en fonction des saisons (Takahashi *et al.*, 2020)**

**\*\* signifie  $p < 0.01$**

Virus	Printemps		Été		Automne		Hiver		Total	
	Avant (n=80)	Après (n=80)	Avant (n=160)	Après (n=80)	Avant (n=160)	Après (n=80)	Avant (n=160)	Après (n=160)	Avant (n=560)	Après (n=400)
Rotavirus	17,5	35,0*	26,9	<b>0,0**</b>	35,6	<b>5,0**</b>	17,5	21,3	25,4	16,5
Torovirus	26,3	<b>0,0**</b>	7,5	2,5	4,4	<b>0,0**</b>	9,4	5,0	9,8	2,5
Entérovirus	47,5	<b>10,0**</b>	35,0	21,3*	40,0	<b>11,3**</b>	55,0	<b>10,6**</b>	43,9	12,8
Coronavirus	33,8	30,0	15,0	12,5	20,6	<b>7,5**</b>	48,1	<b>30,0**</b>	28,8	22,0

Les entérovirus bovins malgré leur grande résistance dans l'environnement sont sensibles à l'amélioration de la biosécurité dans les élevages bovins.

Une étude plus ancienne a également montré que le traitement de lisier de bovins par une aération et par l'addition d'hydroxyde de calcium diminuait fortement la présence des entérovirus bovins (Derbyshire et Brown, 1979).

### **2.5.2. Vaccination**

Aucune vaccination n'a été mise en œuvre ni même testée à ce jour pour lutter contre les entérovirus bovins. La question aujourd'hui est de savoir si cette vaccination est pertinente à établir étant donné la grande prévalence de ces virus, le très faible nombre de manifestations cliniques reportées et une physiopathologie qui est quasiment inconnue aujourd'hui. En effet, l'imputabilité de ces virus dans l'établissement des signes cliniques est souvent discutable vis-à-vis des postulats de Koch décrits précédemment (*cf* § 1.2.1.).

### **2.5.3. Traitement**

Les infections par les entérovirus bovins débouchent sur les mêmes problématiques que d'autres infections virales chez les bovins : aucun traitement spécifique actif contre les entérovirus bovins n'a été répertorié. De plus, l'utilisation d'antiviraux telle qu'on peut la voir en médecine des carnivores domestiques notamment n'est pas extrapolable aux bovins du fait du prix de revient qui serait exorbitant pour un animal de rente ; cependant certaines molécules entrant en compétition avec les « *pocket factor* » des entérovirus seraient des molécules de choix pour lutter contre ces virus en empêchant entre autres leurs décapsidations. À titre d'exemple, l'acide rosmarinique a été testé sur l'entérovirus humain EV71 (espèce *Enterovirus A*) avec succès (Lin *et al.*, 2019).

La seule possibilité est de lutter contre les symptômes de la maladie lors d'infections respiratoires et digestives : on peut donc proposer l'administration d'anti-inflammatoires, des antibiothérapies pour éviter les surinfections bactériennes, des pansements gastriques ou encore des réhydratations si cela s'avère nécessaire. Certaines études ayant rapporté ces signes cliniques ont montré que les bovins atteints guérissaient spontanément sans administration médicamenteuse (Moll et Finlayson, 1957).



#### 2.5.4. Prévention et traitement : bilan

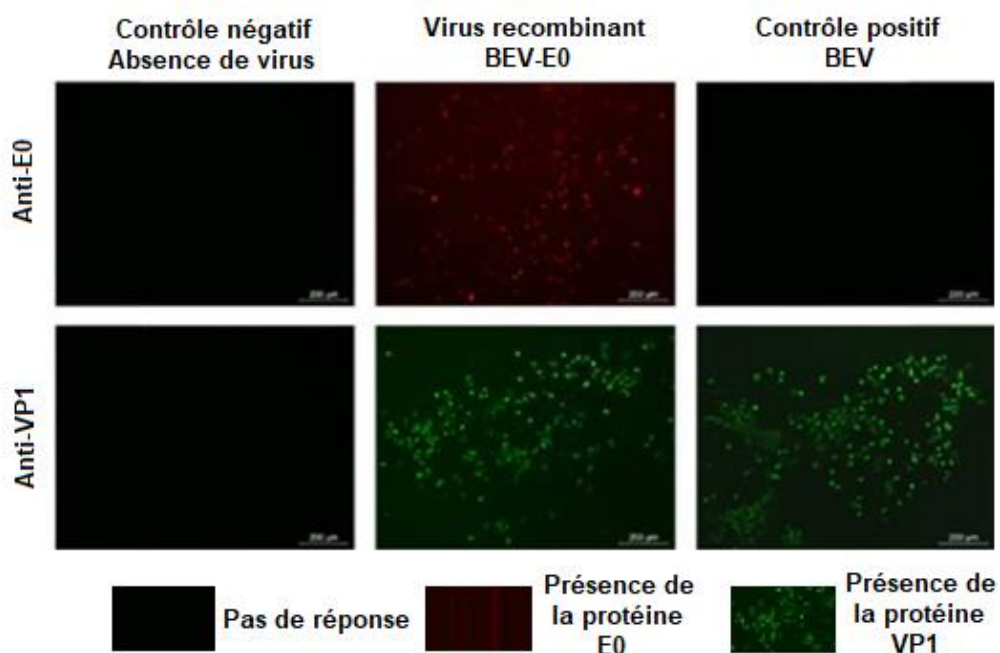
- Les infections par les entérovirus bovins ne se traitent avec aucun traitement spécifique comme pour la majorité des infections virales chez les bovins ; des traitements symptomatiques à base d'anti-inflammatoires, d'antibiotiques, de pansements gastriques et de réhydratation orale ou parentérale peuvent cependant être mis en place.
- Ces virus sont néanmoins très sensibles à un renforcement de mesures hygiéniques au sein d'une exploitation.
- Aucune vaccination n'est disponible et n'a déjà été testée ; cela rejoint une fois de plus la grande difficulté d'application des postulats de Koch aux entérovirus bovins.

## 2.6. Autres applications

### 2.6.1. Vecteurs de vaccin

Les entérovirus bovins par leur virulence très inférieure à celle d'autres virus affectant les bovins en font de très bons candidats en tant que vecteurs de vaccination. Une étude très récente a montré que des entérovirus bovins chez lesquels le gène responsable de l'expression de la protéine E0 du virus de la BVD avait été incorporé induisaient une réponse immunitaire chez l'hôte contre cette protéine (Ren *et al.*, 2020). La figure 27 montre par immunofluorescence une réponse immunitaire des anticorps dirigés contre la protéine VP1 de l'entérovirus bovin initial et des anticorps dirigés contre la protéine E0 du virus BVD chez le virus recombinant BEV-E0 ce qui montre bien que l'expression du gène de la protéine E0 se fait normalement dans les cellules infectées. Le contrôle négatif constitué de cellules MDBK seules ne montre aucune réaction immunitaire. Le contrôle positif constitué de l'entérovirus initial (BEV) montre une réponse immunitaire normale des anticorps dirigés contre la protéine VP1 et l'absence de réponse immunitaire des anticorps anti-E0.

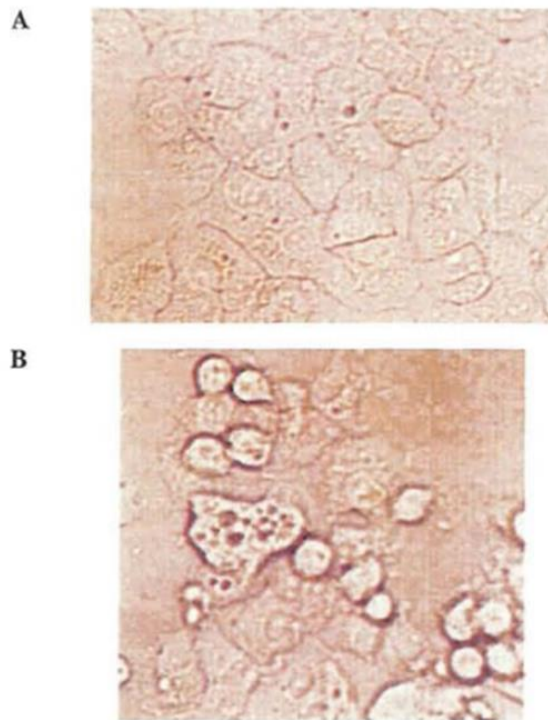
**Figure 27 : Réponses immunitaires d'anticorps anti-E0 et anti-VP1 d'un entérovirus bovin constatées par immunofluorescence sur des cellules infectées par un virus recombinant entérovirus bovin – E0 (BEV-E0) (Ren *et al.*, 2020)**



### 2.6.2. Virus oncolytiques

Les entérovirus bovins ont également montré un effet cytopathique très important sur des cellules cancéreuses humaines : Smyth *et al.* (2002) ont mis en évidence un effet cytopathique majeur sur des cellules d'adénocarcinome mammaire humain alors que leur effet sur les cellules humaines normales est nettement moins observé (Figure 28).

**Figure 28 : Effet cytopathique d'un entérovirus bovin sur des cellules d'adénocarcinome mammaire humain ; A : Cellules tumorales sans virus ; B : Cellules tumorales 16 h après l'inoculation du virus (Smyth *et al.*, 2002)**



### 2.6.3. Autres applications : bilan

- Les entérovirus bovins peuvent servir de vecteurs de vaccination pour d'autres virus du fait de leur grande prévalence et de leur faible pathogénicité constatée sur le terrain comme par exemple pour le virus de la BVD.
- Les entérovirus bovins ont également la capacité d'induire un effet cytopathique plus important sur des cellules cancéreuses que sur des cellules saines d'un hôte : ces virus présentent des caractéristiques oncolytiques.

# Deuxième partie: étude expérimentale

---

## 1. Introduction

Cette étude a été menée par le laboratoire Biosellal de Lyon à la demande du Dr Philippe Giraud, responsable du service de virologie du laboratoire départemental d'analyses du Pas-de-Calais en mars 2016 ; elle a notamment bénéficié d'un financement du groupement de défense sanitaire du Pas-de-Calais.

Le laboratoire du Dr Giraud a recueilli de juillet 2010 à novembre 2015 des échantillons provenant de plusieurs clientèles rurales. Il s'agit dans la plupart des cas de diarrhées sur de jeunes bovins (entre trois et neuf mois) et de bovins adultes chez qui la quasi-totalité des agents pathogènes pouvant être responsables de ces signes cliniques n'ont pas été identifiés (Tableau 13). De plus dans la majorité des cas, ces bovins ont été réfractaires aux traitements et plus particulièrement aux traitements antibiotiques à deux voire trois reprises. Trois de ces prélèvements ne sont pas issus de bovins présentant des diarrhées : un de ceux-ci concerne un veau de cinq mois mort brutalement dans un lot de bovins souffrant d'atteinte respiratoire et les deux autres concernent des vaches ayant avorté dans le dernier tiers de leur gestation. Un effet cytopathique caractéristique des entérovirus bovins a été mis en évidence dans ces seize prélèvements par le laboratoire du Dr Giraud qui ont été conservés en vue d'analyses ultérieures. Le but de l'étude est donc de caractériser plus précisément les virus présents dans ces échantillons grâce au séquençage nouvelle génération (NGS) utilisant la technologie Illumina®.

Cette étude s'est déroulée en deux phases :

- Une première phase de criblage qui consiste en un premier séquençage en aveugle sans prise en compte des commémoratifs des échantillons pour mettre en évidence les séquences de virus présents dans les échantillons.
- Une deuxième phase qui consiste en un reséquençage des séquences retrouvées dans les échantillons pour une analyse plus détaillée de chaque virus et une mise en relation avec les commémoratifs associés à chaque échantillon.

## 2. Étude préalable

Le point de départ de cette étude est l'isolement de virus non identifiés sur des prélèvements biologiques des bovins inclus dans l'étude soumis au laboratoire pour diagnostic. Ces virus présentaient tous un même type d'effet cytopathique (ECP) de type entérovirus. Les cas sur lesquels ces virus étaient isolés apparaissaient avoir des similitudes : en général il était constaté une absence de pathogènes primaires classiquement rencontrés. En l'absence de laboratoire d'expertise sur ce domaine capable de les identifier, il a été décidé de rechercher une solution pour identifier ces virus et interpréter leur place dans les pathologies rencontrées sur le terrain. Le recueil des commémoratifs a également été réalisé pendant cette phase de l'étude.

## 2.1. Commémoratifs

Voici ci-dessous le récapitulatif des prélèvements qui ont été réalisés par les vétérinaires praticiens envoyés au laboratoire du Dr Giraud (Tableau 13).

Tous ces prélèvements sont issus d'animaux qui ont reçu deux voire parfois trois traitements différents sans amélioration clinique. Les détails de ces traitements n'ont pas été renseignés par les vétérinaires praticiens. Les numéros figurant en rouge au niveau des lieux de prélèvements sont reportés sur une carte du Nord-Pas-de-Calais pour plus de visualisation (Figure 29).

**Tableau 13 : Commémoratifs des seize cas de l'étude (D'après P. Giraud)**

Date de réception	N° Biosellal	N° de travail	Nombre de passages sur cellules MDBK	Animal concerné	Nature du prélèvement	N° Cheptel	Lieu de prélèvement	Commémoratifs
22/07/2010	1600009	O48237	3	Veau de quatre mois	Selles	62581043	MONCHY CAYEUX (9)	Diarrhée chronique associée à un retard de croissance
23/06/2011	1600006	O40232	2	Veau de huit mois	Selles	62770105	SAINT-VEINANT (6+7)	Diarrhée chronique depuis trois mois
23/06/2011	1600007	O40233	3	Veau de huit mois	Selles	62770105	SAINT-VEINANT (6+7)	Diarrhée chronique depuis trois mois
25/07/2011	1600008	O40405	4	Veau de six mois	Selles	62261016	CUCQ (8)	Retard de croissance
03/11/2011	1600010	O40842	2	Veau de quatre mois	Selles	62877016	WARLINCOURT LES PAS (10)	Absence de commémoratifs (Prélèvement diarrhéique)
13/01/2012	1600011	O41125	3	Génisse de 18 mois	Selles	62434017	LA HERLIERE (11)	Absence de commémoratifs (Prélèvement diarrhéique)
05/07/2012	1600012	O41905	2	Vache	Selles	62135038	BLAIRVILLE (12+13)	Diarrhée
20/07/2012	1600013	O41964	3	Vache (Blonde d'Aquitaine)	Selles	62135038	BLAIRVILLE (12+13)	Diarrhée
21/11/2013	1600014	O43597	3	Vache	Selles	62604040	NEUFCHATEL HARDELOT (14)	Diarrhée
09/12/2013	1600015	O43658	3	Veau de cinq mois	Poumons	62118005	BETHONSART (15)	Mort brutale dans un lot de génisses présentant de la toux
02/06/2014	1600016	O44368	3	Veau	Selles	62390001	GROFFLIERS (16)	Diarrhée chronique
26/06/2014	1600017	O34949	3	Vache	Placenta	62451036	HEUCHIN (17)	Avortement troisième tiers de gestation
29/09/2014	1600018	O44947	2	Veau de neuf mois	Selles	62108008	BERCK SUR MER (18)	Diarrhée chronique
07/08/2015	1600019	O32931	4	Vache	Placenta	62376073	GONNEHEM (19)	Avortement troisième tiers de gestation
05/11/2015	1600020	O46530	3	Veau	Selles	62808009	TENEUR (20)	Diarrhée
30/11/2015	1600021	O46777	3	Taureau	Selles	62392019	GUEMAPPE (21)	Diarrhée



## **2.2. Tests réalisés avant le séquençage nouvelle génération**

### **2.2.1. Tests généraux d'exploration pour les étiologies les plus rencontrées**

La plupart des agents pathogènes impliqués dans les syndromes diarrhéiques chez le jeune bovin ont dû être recherchés dans les 13 cas présentant des signes digestifs ; cela passe par des analyses bactériologiques, parasitologiques et virologiques visant à déceler la présence d'agents responsables étudiés dans la première partie de ce travail (Tableau 1) (les *Escherichia coli* FY (dorénavant dénommé F17) et CS31A sont deux colibacilles appartenant au pathovar ECET). De plus ces échantillons bovins n'ont pas tous subi les mêmes tests, certains ayant été testés plus que d'autres (Tableau 13).

Il est également nécessaire de chercher d'autres agents pathogènes rencontrés plus fréquemment lors d'avortement ou de détresse respiratoire : dans les deux cas d'avortement, un kit de tests PCR spécifiquement indiqué permet de rechercher huit agents pathogènes principaux responsables d'avortements chez les bovins ; une bactériologie sur le contenu de la caillette d'un des deux avortons a également été réalisée. Dans le cas de mort brutale dans un contexte de problèmes respiratoires, une bactériologie et un test PCR ont été réalisés pour investiguer une potentielle responsabilité d'agents bactériens et viraux, majoritairement rencontrés habituellement dans ces conditions (Tableau 14).

**Tableau 14 : Tests réalisés sur les seize prélèvements par le service du D<sup>r</sup> Giraud**

\* : *Virus Parainfluenza 3*, \*\* : kit PCR huit valences : *BoHV-4*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter fetus*, *Salmonella spp.*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Chlamydomphila spp.* et les leptospires pathogènes, \*\*\* : *Herpèsvirus bovin de type 4*

N°Biosellal	N° de travail	Commémoratifs	Bactériologie	Parasitologie	Virologie	Autres tests	Autres informations
1600009	O48237	Diarrhée chronique et retard de croissance	Négative	Œufs de <i>Capillaria</i> spp. en quantité moyenne, rares coccidies	ELISA E0 sur sang négatif	Non réalisés	Non renseignées
1600006	O40232	Diarrhée chronique	Négative	Non réalisée	Non réalisée	Non réalisés	Non renseignées
1600007	O40233	Diarrhée chronique	Négative	Non réalisée	Non réalisée	Non réalisés	Non renseignées
1600008	O40405	Retard de croissance +/- diarrhée	Présence de <i>Escherichia coli</i> CS31A	Rares coccidies	ELISA <i>Rotavirus/Coronavirus</i> négatif	Même colibacille isolé sur un autre veau du même lot	Non renseignées
1600010	O40842	Absence de commémoratifs (Prélèvement diarrhéique)	Présence de <i>Escherichia coli</i> FY	Rares œufs de <i>Strongyloides</i> spp., coccidies en quantité moyenne	ELISA E0 sur sang négatif	Non réalisés	Virus similaire isolé 10 ans auparavant dans l'élevage
1600011	O41125	Absence de commémoratifs (Prélèvement diarrhéique)	Non réalisée	Coccidies en quantité moyenne	Non réalisée	Non réalisés	Non renseignées
1600012	O41905	Diarrhée	Négative	Négative	Non réalisée	Non réalisés	Non renseignées
1600013	O41964	Diarrhée	Négative	Négative	Non réalisée	PCR paratuberculose positive	Non renseignées
1600014	O43597	Diarrhée	Non réalisée	Non réalisée	ELISA <i>Rotavirus</i> faiblement positif et ELISA <i>Coronavirus</i> négatif	Non réalisés	Non renseignées
1600015	O43658	Mort brutale dans un lot de génisses présentant de la toux	Présence de <i>Pasteurella multocida</i>	Non réalisée	PCR BVD et VRSB (virus respiratoire syncytial bovin) négatives	Non réalisés	Vaccination Rispoval® (BVD/VRSB/Pi3* était à jour
1600016	O44368	Diarrhée chronique	Négative	Négative	ELISA <i>Rotavirus/Coronavirus</i> négatif	Non réalisés	Virus similaire isolé 4 ans auparavant dans l'élevage
1600017	O34949	Avortement troisième tiers de gestation	Non réalisée	Non réalisée	Non réalisée	PCR LSI huit valences** : négative pour tout sauf BoHV-4***	Non renseignées
1600018	O44947	Diarrhée chronique	Négative	Œufs de strongles en quantité moyenne, coccidies en quantité importante	Non réalisée	Non réalisés	Non renseignées
1600019	O32931	Avortement troisième tiers de gestation	Négative sur le contenu de la caillette de l'avorton	Non réalisée	Non réalisée	PCR LSI huit valences négative	Non renseignées
1600020	O46530	Diarrhée	Non réalisée	Test <i>Giardia</i> spp. négatif, rares coccidies	ELISA E0 sur sang négatif	Non réalisés	Non renseignées
1600021	O46777	Diarrhée	Négative	Négative	Négative	Bactériologie après enrichissement : présence de <i>Salmonella</i> Montevideo	Absence de virus en culture sur mélange de prélèvements de selles du troupeau



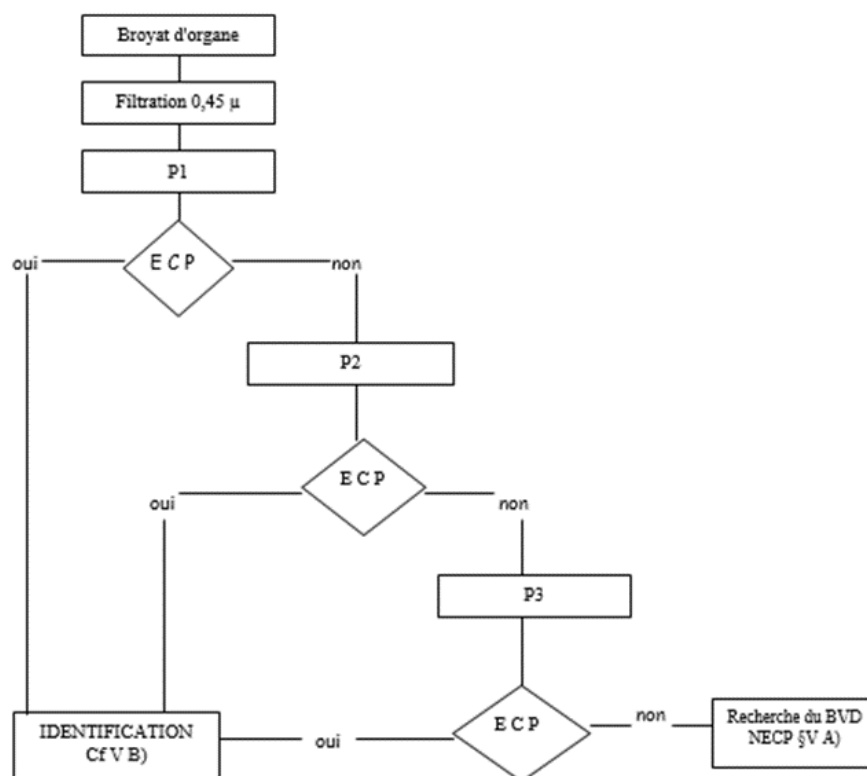
## 2.2.2. Effet cytopathique

La recherche d'un effet cytopathique (ECP) constitue le fondement de l'étude par séquençage nouvelle génération. Ainsi, l'apparition d'un effet cytopathique compatible avec celui d'un entérovirus bovin faisait entrer directement l'échantillon dans l'étude par séquençage nouvelle génération. Cet ECP, décrit dans la première partie de ce travail (cf § 2.4.3.1. de la première partie), se caractérise par un détachement associé à un arrondissement des cellules infectées, se démarquant de l'ECP d'autres virus régulièrement recherchés dans ce laboratoire comme le virus de la BVD, le BoHV-4 ou encore le BoHV-1 (Herpèsvirus de type 1 responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR)).

Pour cela, le laboratoire du D<sup>r</sup> Giraud utilise des cultures de cellules épithéliales de rein de bovins indemne de BVD aussi appelées cellules MDBK (cf § 2.4.3.1. de la première partie pour la présentation).

Les prélèvements (Tableau 13) sont transformés en broyat et le surnageant qui en résulte et mis au contact des lignées de cellules MDBK pour pouvoir constater ou non un effet cytopathique. Il est parfois nécessaire de réaliser plusieurs « passages » c'est-à-dire à un renouvellement de l'étape de culture surnageant/MDBK pour pouvoir observer un effet cytopathique (Figure 30). Ce nombre de passages est relevé dans les commémoratifs (Tableau 13).

**Figure 30 : Mode opératoire pour la mise en évidence d'un ECP (D'après P. Giraud)**



Après la mise en évidence d'un effet cytopathique compatible avec celui d'un entérovirus bovin, le surnageant est congelé et conservé en attendant un nombre suffisant d'échantillons pour réaliser l'étude par séquençage nouvelle génération : les 16 prélèvements de l'étude ont tous induit cet ECP.

## 3. Première phase : le criblage

Le criblage est un tri effectué au sein des séquences présentes dans les échantillons afin d'isoler des séquences propres à un agent pathogène.

### 3.1. Préparation des échantillons

Dans cette phase, même si l'équipe du D<sup>r</sup> Giraud a mis en évidence un effet cytopathique qui semble propre aux entérovirus bovins sur tous les prélèvements, l'étude de BioSella considère dès le départ que les virus présents dans les échantillons sont de nature inconnue, tant par leur structure (enveloppé ou non enveloppé) que par leur matériel génétique (ADN ou ARN, simple ou double brin). Cependant, l'enrichissement des échantillons en matériel génétique est essentiel étant donnée la faible représentation du matériel génétique viral au sein du matériel génétique d'un hôte (moins de 1 %).

Les 16 surnageants ont donc suivi différents procédés très souvent utilisés en recherche de virus inconnus et ont ensuite été traités suivant cinq protocoles après avoir été centrifugés rapidement (cinq minutes à 10000 g) :

- Protocole A : L'échantillon est extrait et traité avec des DNAses puis une étape de Reverse Transcription (RT) est mise en place avec des amorces aléatoires.
- Protocole B : L'échantillon est extrait et traité avec des RNAses.
- Protocole C : L'échantillon est extrait sans être traité puis soumis à une étape de RT (random). C'est ce protocole qui constitue le témoin de l'étude.
- Protocole D1 : L'échantillon est traité simultanément avec des RNAses et des DNAses avant d'être extrait sans étape de RT par la suite.
- Protocole D2 : L'échantillon est traité simultanément avec des RNAses et des DNAses avant d'être extrait puis soumis à une étape de RT avec des amorces aléatoires.

Avant le passage en séquençage nouvelle génération, l'équipe de Biosella montre que le protocole A n'a pas fonctionné correctement. En effet, pour une raison indéterminée, une trop faible quantité d'ADN est présente après le protocole et ce pour tous les surnageants. Celui-ci est donc abandonné par la suite.

Enfin, une librairie est mise en place pour tous les échantillons issus des quatre protocoles restants. Celle-ci est constituée par clivage enzymatique en fragments d'environ 400 paires de bases (400nt) auxquels sont ajoutés des adaptateurs de séquençage et des codes-barres d'identification.

C'est donc un total de 64 échantillons, quatre par surnageant, qui ont été passés simultanément en séquençage nouvelle génération dans une plateforme MiSeq 2x150nt (Figure 24), utilisant la technologie Illumina®. Les codes-barres présents sur chaque fragment permettent de réattribuer les séquences à chaque échantillon après le processus de séquençage nouvelle génération.

## 3.2. Analyse bio-informatique

Environ 2 millions de séquences (appelées « *reads* ») ont été obtenues à la suite de ce séquençage. Le processus d'analyse informatique consistait donc à rechercher parmi toutes ces séquences celles qui pouvaient correspondre à des séquences virales à l'aide d'un logiciel spécialement dédié : le logiciel CLC Genomics Workbench 8.5.1 (Qiagen).

### 3.2.1. Nettoyage

Le nettoyage des données s'est déroulé en deux étapes :

- Une étape de rognage (« *Trimming* ») :

Celle-ci consistait à éliminer toutes les séquences qui étaient trop courtes c'est-à-dire d'une taille inférieure à 50 nt (nucléotides) et à enlever dans leurs régions 3' les parties qui avaient un score de qualité trop faible : la qualité est évaluée grâce au score de Phred (noté Q avec  $Q = -10\log(P)$  où P représente la probabilité d'erreur d'identification d'une base) ; ainsi, un Q inférieur à 20 signifie que P est supérieure à 1 % par utilisation de la formule précédente : il s'agit de la limite en dessous de laquelle les séquences sont exclues de l'analyse dans la grande majorité des séquençages nouvelle génération réalisés aujourd'hui (Liao *et al.*, 2017) et il s'agit du critère retenu dans cette étude :  $Q < 20$  impliquait une exclusion de la région de la séquence en question pouvant aller jusqu'à son exclusion complète si sa taille se trouvait inférieure à 50 nt après ce rognage. De plus, le fait que l'on se soit focalisé sur cette région 3' des séquences est dû au fait que la plupart des erreurs sont présentes dans cette zone. Près de 10 % des séquences ont donc été éliminées car elles étaient trop petites ou de mauvaise qualité.

- Une étape dite de nettoyage (« *Cleaning* ») :

Cette étape était la plus spécifique de cette étude car elle permettait de retirer de l'étude toutes les séquences qui étaient issues du matériel génétique de l'hôte. Un maximum de séquences est donc retiré de cette manière par assemblage contre la référence *Bos taurus* complète (« *Bos taurus UMD3.1.1 Whole Genome Shotgun assembly* »)

Les données ainsi traitées ont donc été prêtes pour une analyse plus poussée. Les séquences restantes après ce nettoyage ont été appelées par la suite « séquences nettoyées » (« *cleaned reads* »).

### 3.2.2. Assemblage de novo

Cette étape consiste en un assemblage des séquences restantes entre elles en l'absence de toute référence connue. Ces « assemblages de séquences » (« contigs ») ont permis de regrouper les séquences de tous les organismes présents dans les échantillons ; ces assemblages ont ensuite été triés en fonction de leur longueur et du nombre de séquences impliquées dans leur structure. Les assemblages qui comprenaient le plus de séquences et donc les plus longs ont été étudiés en priorité.

### 3.2.3. Analyse des assemblages de séquences

Les meilleurs assemblages ont été comparés un par un à la banque génomique non-redondante du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pour mettre en évidence la présence d'organismes différents de celui de l'hôte (*Bos taurus*).

Les séquences de trois organismes principaux ont ainsi été identifiées sans compter *Bos taurus* dont les séquences étaient encore présentes à la fin du processus de séquençage :

- Des séquences d'entérovirus
- Des séquences de bactéries
- Des séquences de bactériophages

### 3.2.4. Analyse du bactériophage et de la bactérie

Pour les séquences de bactéries, l'organisme le plus proche trouvé était systématiquement une bactérie du genre *Pseudomonas*, sans plus de précisions sur la souche (une des souches du NCBI ressortant le plus fréquemment était *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, mais cette souche était très certainement une autre souche de *Pseudomonas* d'après l'équipe de Biosellal).

Pour les séquences de bactériophages, l'organisme le plus proche était systématiquement un phage de *Pseudomonas* (*Podoviridae*, virus non enveloppé à double brin d'ADN). De plus, il y a une corrélation entre le nombre de séquences correspondant à une bactérie du genre *Pseudomonas* et le nombre de séquences correspondant au phage de *Pseudomonas* au sein d'un même échantillon (Tableau 15). En effet d'après l'équipe de Biosellal, il est très fréquent de séquencer une bactérie et le phage qui lui est associé lors de séquençages environnementaux.

Lorsque l'ensemble des séquences correspondant au bactériophage a été mis en commun, il s'est avéré qu'elles étaient identiques dans l'ensemble des échantillons. Pour la bactérie, la faible couverture ne permettait pas de conclure de façon aussi catégorique mais les quelques régions communes semblaient indiquer la même chose, à savoir une origine commune. En effet, il n'y a pas de différences de séquences entre les échantillons. La taille du génome du bactériophage est estimée à environ 38 000 paires de bases et le nombre de séquences permet une couverture moyenne de 3x, c'est-à-dire que la longueur totale des séquences correspondant au bactériophage n'est que trois fois supérieure à la longueur de son propre génome, ce qui est insuffisant pour avoir une séquence consensus complète mais suffisant pour obtenir une identification fiable. Il s'agissait donc d'une souche de *Pseudomonas-like* et de son probable bactériophage associé.

Sachant que les séquences de phages sont identiques dans tous les surnageants, cela suggérait une origine de contamination commune, probablement en laboratoire. D'autres échantillons d'un projet complètement différent ont été séquencés sur le même cycle de séquençage et une analyse détaillée des séquences n'a révélé la présence d'aucune séquence correspondant à ce bactériophage. L'origine de la contamination est donc probablement antérieure à l'arrivée des échantillons dans le laboratoire de Biosellal.

Enfin, il fallait noter que la contamination présente dans ces échantillons était extrêmement faible et correspondait à environ 1000 séquences nettoyées : cela signifiait que sur l'ensemble des échantillons, le bactériophage représentait moins de 0,003 % des séquences brutes c'est-à-dire celles obtenues avant l'étape de nettoyage (environ 30 millions obtenues) et seulement 1 % des séquences nettoyées (environ 100 000 obtenues). La détection de ce bactériophage nous renseigne donc sur la grande sensibilité de cette méthode.

### 3.2.5. Analyse des séquences d'entérovirus

Une analyse fine des séquences d'entérovirus retrouvées dans les échantillons a montré qu'elles étaient toutes proches des entérovirus bovins (Espèces *Enterovirus E* et *Enterovirus F* du genre *Enterovirus*). Cependant contrairement au bactériophage, les séquences d'entérovirus n'étaient pas les mêmes d'un échantillon à l'autre. De plus ces séquences étaient les séquences virales majoritaires puisqu'elles représentaient entre 2,6 et 50,3 % de l'ensemble des séquences nettoyées (Tableau 15).

**Tableau 15 : Répartition des séquences entérovirus/ *Pseudomonas* / bactériophage en fonction des 16 surnageants (D'après Biosellal)**

N° Biosellal	N° de travail	Séquences brutes	Séquences nettoyées	Entérovirus	<i>Pseudomonas</i>	Bactériophage	Entérovirus % séquences nettoyées	<i>Pseudomonas</i> % séquences nettoyées	Bactériophage % séquences nettoyées
1600006	O40232	1862452	7118	3302	56	27	46,4%	0,8%	0,4%
1600007	O40233	1956354	2466	1241	22	9	50,3%	0,9%	0,3%
1600008	O40405	2169094	9433	3647	18	10	38,7%	0,2%	0,1%
1600009	O48237	1752320	32028	7182	238	609	22,4%	0,7%	1,9%
1600010	O40842	2459106	2082	379	19	5	18,2%	0,9%	0,2%
1600011	O41125	1722672	6014	1647	52	27	27,4%	0,9%	0,4%
1600012	O41905	2271660	3377	1094	12	5	32,4%	0,4%	0,1%
1600013	O41964	1871664	2304	279	27	18	12,1%	1,2%	0,8%
1600014	O43597	1863226	10298	767	190	225	7,4%	1,8%	2,2%
1600015	O43658	1762614	1548	202	26	10	13,0%	1,7%	0,6%
1600016	O44368	2219518	6569	1591	71	16	24,2%	1,1%	0,2%
1600017	O34949	2329142	3584	1571	18	12	43,8%	0,5%	0,3%
1600018	O44947	2120608	4760	1098	29	24	23,1%	0,6%	0,5%
1600019	O32931	1821840	3588	765	12	15	21,3%	0,3%	0,4%
1600020	O46530	2360218	1124	30	14	3	2,6%	1,3%	0,2%
1600021	O46777	1773282	2519	211	34	17	8,4%	1,4%	0,7%



Du fait de la non concordance des séquences entre chaque échantillon, il a fallu déterminer les séquences consensus de ces entérovirus individuellement. Une procédure particulière, décrite ci-dessous a été mise en place :

- La séquence d'entérovirus la plus proche trouvée par confrontation des assemblages de séquences obtenus *de novo* avec la banque non redondante du NCBI était identifiée.
- Un nouvel assemblage des séquences nettoyées était cette fois réalisé avec une séquence référence correspondant à la séquence d'entérovirus préalablement identifiée.
- Le premier assemblage réalisé était dans la majorité des cas de mauvaise qualité car la séquence choisie pour la référence était souvent trop éloignée de celle présente dans l'échantillon. Il a donc fallu réaliser plusieurs cycles d'assemblage et des corrections manuelles.
- La séquence consensus obtenue était souvent partielle car la couverture par rapport au génome viral complet n'était pas suffisante pour séquencer complètement le virus.
- L'alignement des séquences consensus entre-elles, même si elles étaient partielles, mettait en évidence des séquences différentes selon les échantillons.

De plus, aucun lien n'a pu être mis en évidence entre le nombre de séquences d'entérovirus trouvées et le nombre de passages indiqués pour le surnageant lors de la recherche d'un ECP, le type de prélèvement ou le commémoratif associé (Tableau 16)

**Tableau 16 : Tableau comparatif entre fréquences des séquences, nombre de passages, type de prélèvement et commémoratifs pour chaque surnageant (D'après Biosellal)**

N° Biosellal	N° de travail	Entérovirus % séquences nettoyées	Pseudomonas % séquences nettoyées	Bactériophage % séquences nettoyées	Nombre de passages	Prélèvement et âge	Commémoratifs
1600006	O40232	46,4%	0,8%	0,4%	2	féces BV 5367-6 à 8 mois	diarrhée chronique depuis 3 mois
1600007	O40233	50,3%	0,9%	0,3%	3	féces BV 5368-6 à 8 mois	diarrhée chronique depuis 3 mois
1600008	O40405	38,7%	0,2%	0,1%	4	féces veau 3-6 MOIS	Retard de croissance
1600009	O48237	22,4%	0,7%	1,9%	3	féces veau 4 mois 1823	diarrhée chronique /retard de croissance
1600010	O40842	18,2%	0,9%	0,2%	2	féces veau 4 MOIS 6336	Absence commémoratif (diarrhée)
1600011	O41125	27,4%	0,9%	0,4%	3	féces génisse 18 mois	Absence commémoratif (diarrhée)
1600012	O41905	32,4%	0,4%	0,1%	2	féces vache 3159	Diarrhée
1600013	O41964	12,1%	1,2%	0,8%	3	féces BV 3104 adulte	Diarrhée
1600014	O43597	7,4%	1,8%	2,2%	3	féces vache	Diarrhée
1600015	O43658	13,0%	1,7%	0,6%	3	poumon veau 5 mois	Mort brutal dans un lot de génisses avec toux
1600016	O44368	24,2%	1,1%	0,2%	3	féces veau 2926	Diarrhée chronique
1600017	O34949	43,8%	0,5%	0,3%	3	PLACENTA AVORT BV 7064	Avortement à 8 mois
1600018	O44947	23,1%	0,6%	0,5%	2	féces veau 9 MOIS -9925	diarrhée chronique
1600019	O32931	21,3%	0,3%	0,4%	4	PLACENTA AVORT	Avortement 3ème tiers
1600020	O46530	2,6%	1,3%	0,2%	3	FECES BV 6828 4 mois	Diarrhée
1600021	O46777	8,4%	1,4%	0,7%	3	FECES BV 6854 taureau	Diarrhée

### 3.3. Conclusions de la première phase

L'équipe de Biosellal avait tout de même recherché dans les assemblages de séquences minoritaires et dans les séquences restantes la présence d'autres virus potentiels sans succès. Les entérovirus bovins étaient de loin les agents pathogènes les plus représentés, loin devant le faible pourcentage de séquences correspondant à la bactérie du genre *Pseudomonas* et au bactériophage qui lui est associé. Il est donc plausible que ces entérovirus bovins soient responsables des effets cytopathiques observés dans le laboratoire du D<sup>r</sup> Giraud.

Lorsque l'on compare les protocoles utilisés lors de l'extraction, on constate que le meilleur protocole est le protocole D. En effet, celui-ci fait agir DNAses et RNAses avant extraction ce qui a pour but de digérer tout le matériel génétique de l'hôte tout en préservant le matériel génétique du virus puisque celui-ci présente une enveloppe ou une capsid empêchant l'action de ces enzymes. De ce fait, les particularités de ce protocole en ont fait une étape d'enrichissement très intéressante pour cette étude (Tableau 17, Tableau 18).

Le protocole C servait essentiellement de contrôle pour l'étude. Il a tout de même permis la détection d'entérovirus bovins du fait de l'étape de RT sur un virus à ARN mais en quantité vingt fois moindre puisqu'il n'y avait pas eu de traitement particulier à base d'enzymes dans ce protocole.

Le protocole A (Extraction puis DNase puis RT), abandonné dès le début du fait de la faible quantité d'ADN obtenue, aurait pu donner de bons résultats sur des entérovirus bovins pour les mêmes raisons que le protocole D.

De plus, le protocole D2 comprenant une étape de RT est nettement meilleur que le protocole D1 qui ne comprend pas d'étape de RT sur les entérovirus bovins alors que ceux-ci sont des virus à ARN. De ce fait, aucune différence n'est notable entre les deux protocoles pour les bactéries et les bactériophages puisque le support de leur matériel génétique est de l'ADN. Pour ces mêmes raisons structurelles, le protocole B ne pouvait pas fonctionner sans étape de RT.

**Tableau 17 : Répartition des séquences brutes entérovirus / *Pseudomonas* / bactériophage en fonction des différents protocoles d'extraction (D'après Biosellal)**

Protocole	D2	D1	B	C
Séquences brutes	3378438	7262064	10813366	10566066
Séquences d'entérovirus	23698	48	68	1193
Séquences de <i>Pseudomonas</i>	366	341	77	54
Séquences du bactériophage	823	207	1	0
% séquences d'entérovirus	0,70 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %
% séquences de <i>Pseudomonas</i>	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
% séquences du bactériophage	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

**Tableau 18 : Répartition des séquences nettoyées entérovirus / *Pseudomonas* / bactériophage en fonction des différents protocoles d'extraction (D'après Biosellal)**

Protocole	D2	D1	B	C
Séquences nettoyées	66277	21671	4014	6853
Séquences d'entérovirus	23698	48	68	1193
Séquences de <i>Pseudomonas</i>	366	341	77	54
Séquences du bactériophage	823	207	1	0
% séquences d'entérovirus	35,76 %	0,22 %	1,70 %	17,41 %
% séquences de <i>Pseudomonas</i>	0,55 %	1,57 %	1,92 %	0,79 %
% séquences du bactériophage	1,24 %	0,96 %	0,01 %	0,00 %



## 4. Deuxième phase : l'affinage

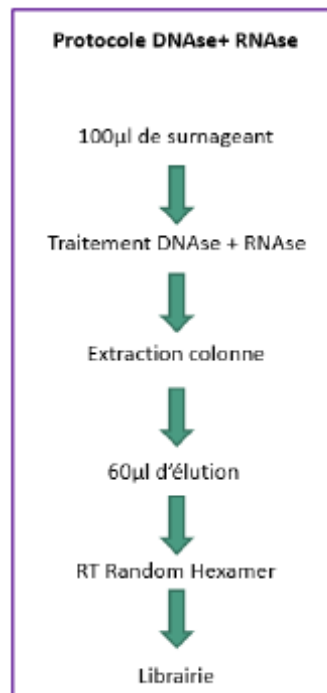
Le but de cette deuxième phase de séquençage est d'augmenter considérablement la couverture des échantillons en privilégiant le protocole qui a le mieux fonctionné dans la phase précédente c'est à dire le protocole D2 (échantillon traité simultanément avec des RNAses et des DNAses avant d'être extrait puis soumis à une étape de RT avec des amorces aléatoires).

### 4.1. Protocole

Le protocole d'extraction D2 a été renouvelé pour les 16 surnageants (Figure 31) :

**Figure 31 : Protocole d'extraction utilisé dans la deuxième phase de l'étude sur les 16 surnageants (D'après Biosellal)**

« *Random Hexamer* » : amorce aléatoire



Le même protocole bio-informatique que celui utilisé lors de la première phase a été mis en place à savoir une étape de nettoyage comprenant des étapes de rognage et de nettoyage *sensu stricto* et différentes étapes d'assemblage. Ainsi, les séquences nettoyées sont utilisées à la fois en assemblage *de novo* et en assemblage avec référence pour reconstruire les séquences consensus des entérovirus présents dans les 16 échantillons : l'assemblage *de novo* sert à corriger les biais du modèle observés en assemblage avec référence. Une fois ces biais principaux corrigés, plusieurs itérations d'assemblage avec référence permettent d'obtenir un consensus le plus complet et le plus juste possible. Les couvertures moyennes et la longueur des assemblages de séquences obtenues au final pour chaque virus sont présentés dans le tableau 19, en comparaison avec d'autres entérovirus bovins du NCBI appartenant aux espèces *Enterovirus E* et *Enterovirus F*.

**Tableau 19 : Couvertures moyennes et taille des assemblages de séquences obtenues pour les 16 entérovirus retrouvés et comparaison avec d'autres souches d'entérovirus (D'après Biosellal)**

	Nom attribué au virus	N° Biosellal	Taille de l'assemblage	Couverture moyenne
Virus présents dans les échantillons	O48237_Bovine_Enterovirus_F	1600009	7193	2848
	O40232_Bovine_Enterovirus_E	1600006	7209	577
	O40233_Bovine_Enterovirus_E	1600007	7209	217
	O40405_Bovine_Enterovirus_F	1600008	7192	1489
	O40842_Bovine_Enterovirus_E	1600010	7183	123
	O41125_Bovine_Enterovirus_E	1600011	7208	475
	O41905_Bovine_Enterovirus_E	1600012	7211	357
	O41964_Bovine_Enterovirus_E	1600013	7206	84
	O43597_Bovine_Enterovirus_E	1600014	7205	209
	O43658_Bovine_Enterovirus_E	1600015	7238	78
	O44368_Bovine_Enterovirus_E	1600016	7209	652
	O34949_Bovine_Enterovirus_E	1600017	7212	359
	O44947_Bovine_Enterovirus_E	1600018	7207	383
	O32931_Bovine_Enterovirus_E	1600019	7186	437
	O46530_Bovine_Enterovirus_F	1600020	7196	11
	O46777_Bovine_Enterovirus_E	1600021	7211	37
	Nom du virus	Espèce	Taille	N° dépôt NCBI
Virus de référence	BEV-E_K2577_AF123432	<i>Enterovirus E</i>	7206	AF123432
	BEV-E_PA12-24791_KC667561	<i>Enterovirus E</i>	7216	KC667561
	BEV-E_SL305_AF123433	<i>Enterovirus E</i>	7210	AF123433
	BEV-E1_VG527_D00214	<i>Enterovirus E</i>	7216	D00214
	BEV-E2_BEV-165	<i>Enterovirus E</i>	7209	
	BEV-F_3A_AY508697	<i>Enterovirus F</i>	7193	AY508697
	BEV-F_BHM26_HQ917060	<i>Enterovirus F</i>	7191	HQ917060
	BEV-F_BJ001_HQ663846	<i>Enterovirus F</i>	7195	HQ663846
	BEV-F_BJ50_HQ917061	<i>Enterovirus F</i>	7195	HQ917061
	BEV-F_IL-Alpaca_KC748420	<i>Enterovirus F</i>	7196	KC748420
	BEV-F_PS87_AY508696	<i>Enterovirus F</i>	7190	AY508696
	BEV-F1_BEV-261_DQ092770	<i>Enterovirus F</i>	7197	DQ092770
	BEV-F2_DQ092795	<i>Enterovirus F</i>	7190	DQ092795
	BEV-F2_Egypt2014_KM667941	<i>Enterovirus F</i>	7193	KM667941
	BEV-F3_PS87-Belfast_DQ092794	<i>Enterovirus F</i>	7194	DQ092794
BEV-F4_W1_AY462106	<i>Enterovirus F</i>	7191	AY462106	

Pour la grande majorité des échantillons, la couverture est largement suffisante pour obtenir l'intégralité de la polyprotéine associée à la sortie de la NGS. L'échantillon O46530 (N° Biosellal 1600020) qui a la couverture la plus basse (11) n'était pas couvert à l'extrémité C-terminale de la protéine et selon les échantillons, une partie des régions 3'UTR et 5'UTR est manquante. Pour pallier ce problème, deux PCR spécifiques de ces régions ont été utilisées pour pouvoir les compléter par séquençage Sanger. L'amplification de la région 3'UTR a fonctionné sur la plupart des échantillons ce qui a permis de terminer le séquençage de la polyprotéine de O46530. Néanmoins, le séquençage de la région 5'UTR fut un échec sur tous les échantillons.

La longueur totale des assemblages de séquences est d'environ 7200 nt.

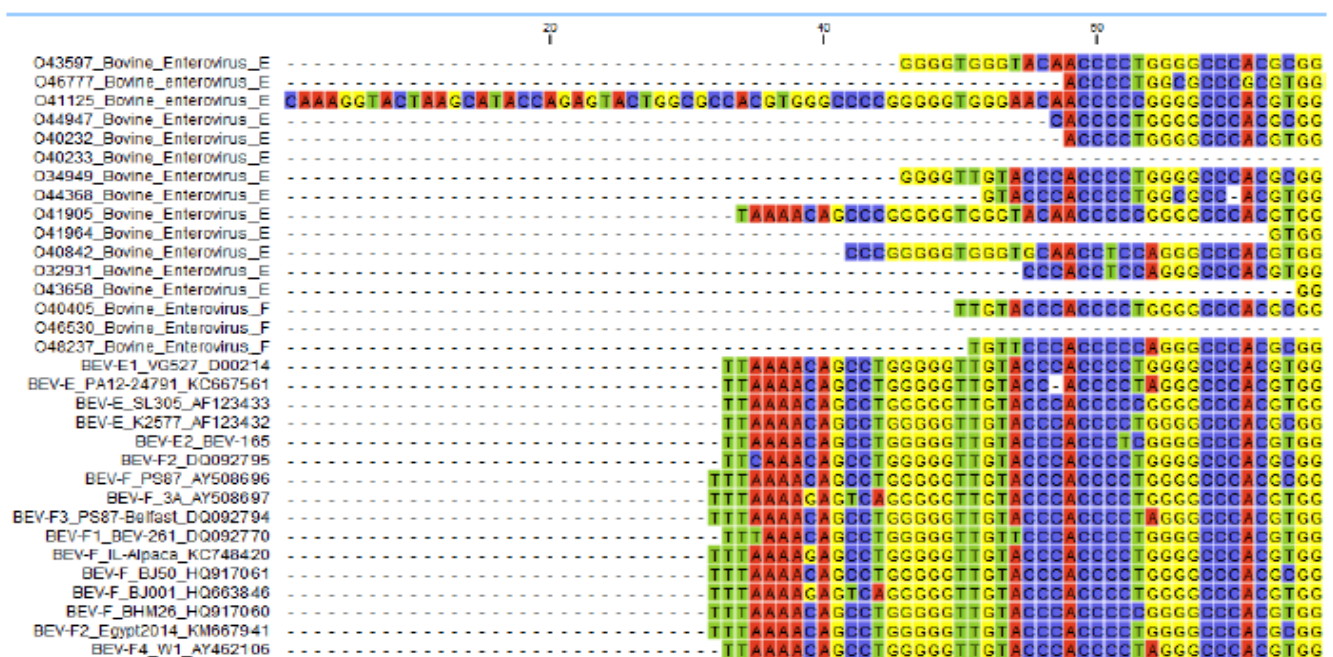
## 4.2. Analyses et conclusions

### 4.2.1. Régions 5'UTR et 3'UTR

La région 5'UTR est longue d'environ 840 nt. Malgré l'absence de séquençage Sanger pour cette région, les séquences sont presque complètes pour tous les échantillons (Figure 32) excepté pour O40233 (N° Biosellal 1600007) pour lequel il manque environ 70 nt et O46530 (N° Biosellal 1600020) pour lequel il manque environ 180 nt.

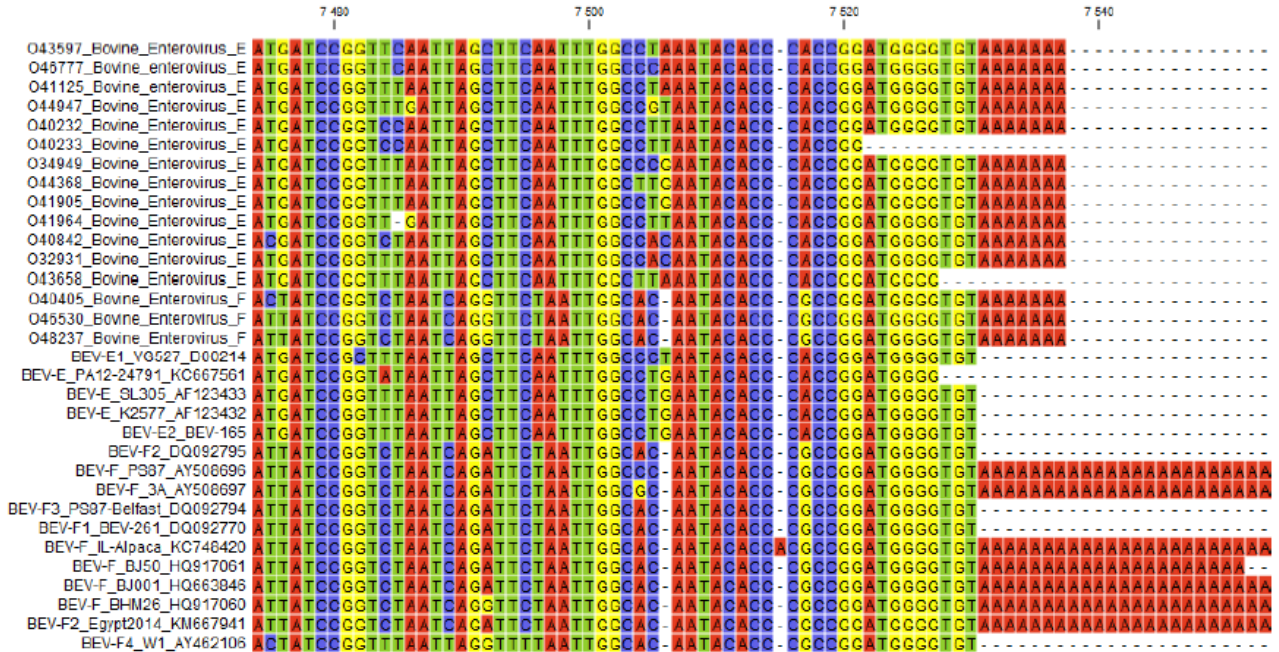
L'échantillon O41125 (N° Biosellal 1600011) présente une séquence 5'UTR atypique, plus longue et différente des souches NCBI au niveau des 40 premiers nucléotides. Ces régions terminales sont palindromiques et donc compliquées à assembler, l'assemblage a donc été revérifié plusieurs fois mais s'est finalement révélé correct malgré une séquence très différente des autres souches.

**Figure 32 : Alignement multiple des souches issues des surnageants en comparaison avec celles disponibles sur NCBI : vue détaillée de la région 5'UTR (D'après Biosellal)**



La région 3'UTR est longue d'environ 100 nt. Ces virus présentent une queue polyA dans cette région ce qui facilite la PCR. Il ne manque alors que 16 nt pour O40233 (N° Biosellal 1600007) et 10 nt pour O43658 (N° Biosellal 16000015) (Figure 33).

**Figure 33 : Alignement multiple des souches issues des surnageants en comparaison avec celles disponibles sur NCBI : vue détaillée de la région 3'UTR (D'après Biosellal)**



#### 4.2.2. Polyprotéine

La polyprotéine est complète pour les 16 virus présents dans les échantillons. Un génotypage de nouvelles souches a été permis en alignant tous les assemblages de séquences complets avec les séquences de référence du NCBI choisies dans les deux génotypes d'entérovirus existant dans l'espèce bovine (*Enterovirus E* et *Enterovirus F*) (Figure 34). Au total, trois échantillons correspondent à des souches appartenant à l'espèce *Enterovirus E* et les 13 autres souches correspondent à des souches appartenant à l'espèce *Enterovirus F*. L'arbre phylogénétique ainsi obtenu a été réalisé grâce à un système de reconstitution d'arbres phylogénétiques spécifique (« *Neighbour Joining* ») à l'aide du logiciel CLC Genomics Workbench 8.5.1..

Cet alignement a également permis d'obtenir une matrice d'homologie (Tableau 20) entre les souches, ce qui va donner un pourcentage d'homologie entre chaque séquence, noté %Id. Ce critère est indispensable pour classer les entérovirus (cf. § 2.1.1. de la partie bibliographique).



Figure 34 : Arbre phylogénétique des entérovirus présents dans les échantillons et de séquences d'entérovirus de référence des espèces *Enterovirus E* et *Enterovirus F* issues du site NCBI (D'après Biosellal)

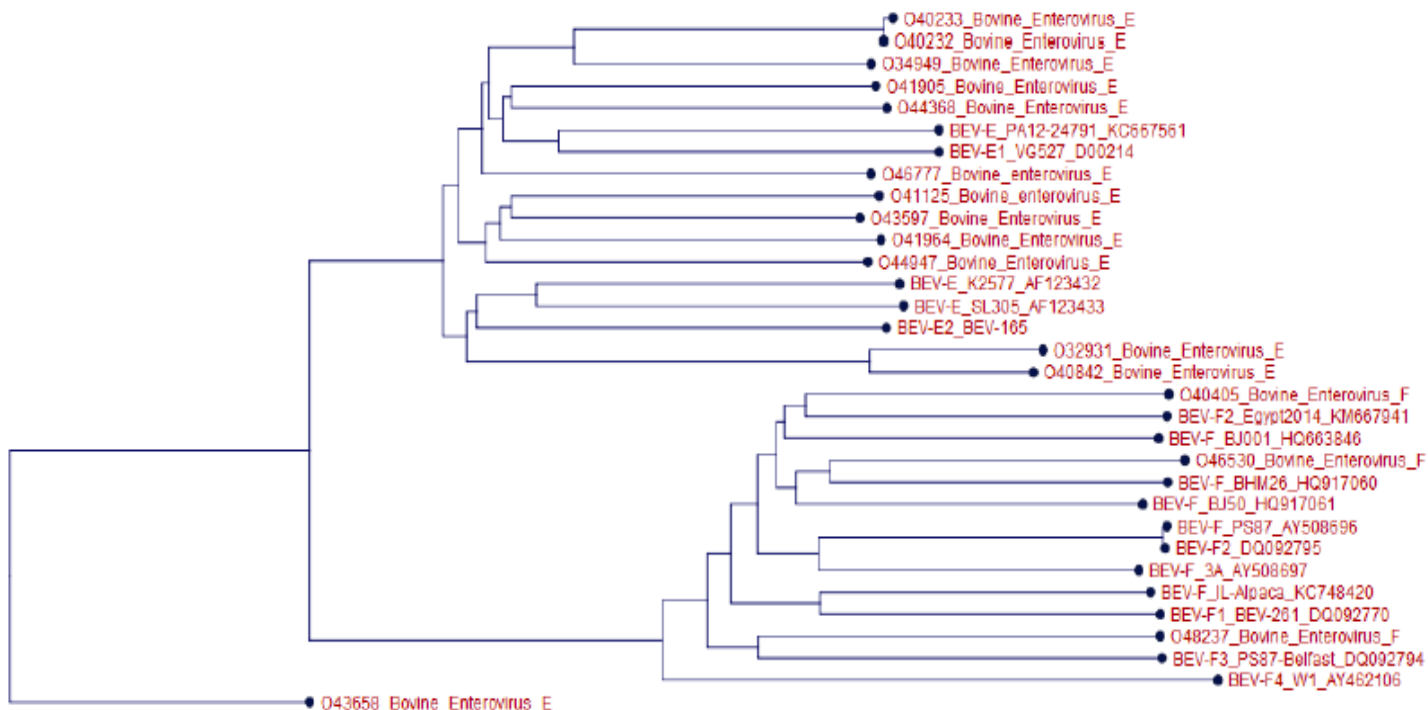


Tableau 20 : Matrice d'homologie des entérovirus présents dans les échantillons et de séquences d'entérovirus de référence des espèces *Enterovirus E* et *Enterovirus F* issues du site NCBI (D'après Biosellal)

Rouge : moins de 70 % d'homologie ; permet de différencier les deux espèces ; vert : plus de 90 % d'homologie

%Id (Homologies)	Name	Name																															
		O43597_Bovine_Enterovirus_E	O46777_Bovine_enterovirus_E	O41125_Bovine_enterovirus_E	O44947_Bovine_Enterovirus_E	O40232_Bovine_Enterovirus_E	O40233_Bovine_Enterovirus_E	O34949_Bovine_Enterovirus_E	O44368_Bovine_Enterovirus_E	O41905_Bovine_Enterovirus_E	O41964_Bovine_Enterovirus_E	BEV-E1_VG527_D00214	BEV-E_K2577_AF123432	BEV-E2_BEV-165	O32931_Bovine_Enterovirus_E	O40842_Bovine_Enterovirus_E	O40405_Bovine_Enterovirus_F	BEV-F2_Egypt2014_KM667941	BEV-F_BJ001_HQ063846	O46530_Bovine_Enterovirus_F	BEV-F_BHM26_HQ917060	BEV-F_BJ50_HQ917061	BEV-F_PS87_AY508696	BEV-F2_DQ092795	BEV-F_3A_AY508697	BEV-F_JL-Alpaca_KC748420	BEV-F1_BEV-281_DQ092770	O48237_Bovine_Enterovirus_F	BEV-F3_PS87-Belfast_DQ092794	BEV-F4_W1_AY462106			
	Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	14	15	16	17	18	19	27	28	29	30	31	32	19	27	28	29	30	31	32		
Enterovirus E	O43597_Bovine_Enterovirus_E	1	80,9	81,7	80,3	79,2	79,2	79,8	79,7	79,0	81,2	77,5	78,8	79,2	75,2	75,8	72,1	66,7	66,9	67,3	67,0	67,5	67,4	65,6	66,7	67,0	67,0	67,2	67,3	67,4	65,7		
	O46777_Bovine_enterovirus_E	2	80,9	79,1	79,8	80,0	80,0	80,6	80,1	80,2	79,2	78,7	77,2	77,4	74,7	75,1	72,0	67,0	67,0	67,0	67,2	67,3	67,4	65,7	66,9	67,0	67,0	67,2	67,3	67,4	65,7		
	O41125_Bovine_enterovirus_E	3	81,7	79,1		81,1	78,9	78,9	79,3	78,7	79,5	80,8	77,1	78,9	78,6	75,1	75,6	71,2	66,9	66,5	66,7	66,6	66,5	66,6	65,7	66,9	66,5	66,7	66,6	66,5	66,6	65,7	
	O44947_Bovine_Enterovirus_E	4	80,3	79,8	81,1		79,6	79,6	79,4	78,8	79,6	80,4	77,5	78,8	78,9	74,9	75,2	72,0	67,2	67,3	67,2	67,1	67,0	67,6	66,0	66,8	67,0	66,9	66,9	67,2	67,1	66,2	
	O40232_Bovine_Enterovirus_E	5	79,2	80,0	78,9	79,6		99,7	84,2	80,2	80,1	78,9	79,0	77,2	77,1	74,0	74,4	72,4	66,8	67,0	66,9	66,9	67,2	67,1	66,2	66,8	67,0	66,9	66,9	67,2	66,4	67,0	65,3
	O40233_Bovine_Enterovirus_E	6	79,2	80,0	78,9	79,6	99,7		84,3	80,2	80,1	78,9	79,0	77,3	77,1	74,0	74,5	72,2	66,8	67,0	66,9	66,8	67,2	67,0	66,2	66,8	67,0	66,9	66,8	67,2	67,0	66,2	
	O34949_Bovine_Enterovirus_E	7	79,8	80,6	79,3	79,4	84,2	84,3		80,5	80,7	78,7	78,7	77,9	77,6	73,9	74,6	72,6	67,0	67,0	67,5	67,0	66,9	67,7	66,3	66,9	67,2	66,9	67,2	66,4	67,0	65,3	
	O44368_Bovine_Enterovirus_E	8	79,7	80,1	78,7	78,8	80,2	80,2	80,5		81,3	78,7	79,8	77,5	77,8	74,1	74,5	71,7	66,9	67,2	66,9	67,2	66,4	67,0	65,3	66,9	67,2	66,9	67,2	66,4	67,0	65,3	
	O41905_Bovine_Enterovirus_E	9	79,0	80,2	79,5	79,6	80,1	80,1	80,7	81,3		79,1	79,7	76,8	78,1	75,1	75,2	72,1	66,3	66,9	66,7	67,1	66,9	67,1	66,0	66,3	66,9	66,7	67,1	66,9	67,1	66,0	
	O41964_Bovine_Enterovirus_E	10	81,2	79,2	80,8	80,4	78,9	78,9	78,7	78,7	79,1		77,2	78,7	78,9	75,4	75,4	71,8	67,1	67,0	67,2	66,7	67,0	66,8	65,8	67,1	67,0	67,2	66,7	67,0	66,8	65,8	
	BEV-E1_VG527_D00214	11	77,5	78,7	77,1	77,5	79,0	79,0	78,7	79,8	79,7	77,2		77,6	78,9	73,9	74,6	72,4	66,3	65,7	66,2	65,9	66,4	66,1	65,6	66,3	65,7	66,2	65,9	66,4	66,1	65,6	
	BEV-E_K2577_AF123432	14	78,8	77,2	78,9	78,8	77,2	77,3	77,9	77,5	76,8	78,7	77,6		79,1	75,3	75,7	71,4	66,3	66,5	66,5	66,5	66,2	66,5	65,2	66,3	66,5	66,5	66,5	66,2	66,5	65,2	
	BEV-E2_BEV-165	15	79,2	77,4	78,6	78,9	77,1	77,1	77,6	77,8	78,1	78,9	78,9	79,1		75,5	76,0	71,6	67,1	67,1	67,2	66,8	66,9	66,7	65,6	67,1	67,1	67,2	66,8	66,9	66,7	65,6	
	O40842_Bovine_Enterovirus_E	16	75,2	74,7	75,1	74,9	74,0	74,0	73,9	74,1	75,1	75,4	73,9	75,3	75,5		90,8	68,5	65,7	66,5	66,9	66,6	66,5	66,2	64,9	65,7	66,5	66,9	66,6	66,5	66,2	64,9	
	O32931_Bovine_Enterovirus_E	17	75,8	75,1	75,6	75,2	74,4	74,5	74,6	74,5	75,2	75,4	74,6	75,7	76,0	90,8		68,9	65,1	65,6	66,3	65,7	65,4	65,5	64,5	65,1	65,6	66,3	65,7	65,4	65,5	64,5	
	O43658_Bovine_Enterovirus_E	18	72,1	72,0	71,2	72,0	72,4	72,2	72,6	71,7	72,1	71,8	72,4	71,4	71,6	68,5	68,9		65,8	66,4	66,4	66,2	66,3	66,6	66,4	65,8	66,4	66,4	66,2	66,3	66,6	66,4	
Enterovirus F	BEV-F2_DQ092795	19	66,7	67,0	66,9	67,2	66,8	66,8	67,0	66,9	66,3	67,1	66,3	66,3	67,1	65,7	65,1	65,8		78,4	78,5	79,3	79,5	77,1	73,0	66,7	67,0	66,5	67,3	67,0	67,0	73,0	
	BEV-F_BHM26_HQ917060	27	66,9	67,0	66,5	67,3	67,0	67,0	67,0	67,2	66,9	67,0	65,7	66,5	67,1	66,5	65,6	66,4	78,4		82,6	79,6	80,6	78,2	72,9	66,9	67,0	66,5	67,3	67,0	67,0	73,0	
	O46530_Bovine_Enterovirus_F	28	67,3	67,0	66,7	67,2	66,9	66,9	67,5	66,9	66,7	67,2	66,2	66,5	67,2	66,9	66,3	66,4	78,5	82,6		80,2	80,7	77,6	73,3	66,9	67,0	66,7	67,2	66,9	66,9	73,3	
	BEV-F2_Egypt2014_KM667941	29	67,0	67,2	66,6	67,1	66,9	66,8	67,0	67,2	67,1	66,7	65,9	66,5	66,8	66,6	65,7	66,2	79,3	79,6	80,2		81,8	77,7	73,5	67,0	67,2	66,6	67,1	66,9	66,8	73,5	
	O40405_Bovine_Enterovirus_F	30	67,5	67,3	66,5	67,0	67,2	67,2	66,9	66,4	66,9	67,0	66,4	66,2	66,9	66,5	65,4	66,3	79,5	80,6	80,7	81,8		78,4	73,2	67,5	67,3	66,5	67,0	67,2	67,2	73,2	
	O48237_Bovine_Enterovirus_F	31	67,4	67,4	66,6	67,6	67,1	67,0	67,7	67,0	67,1	66,8	66,1	66,5	66,7	66,2	65,5	66,6	77,1	78,2	77,6	77,7	78,4		75,4	67,4	67,4	66,6	67,6	67,1	67,0	75,4	
	BEV-F4_W1_AY462106	32	65,6	65,7	65,7	66,0	66,2	66,2	66,3	65,3	66,0	65,8	65,6	65,2	65,6	64,9	64,5	66,4	73,0	72,9	73,3	73,5	73,2	75,4	65,6	65,7	65,7	66,0	66,2	66,2	75,4		

Toutes les séquences de référence du NCBI présentes dans l'arbre de distance ne sont pas présentes dans la matrice d'homologie par souci de réduction de la taille du tableau.

### **4.2.3. Clusters E et F**

#### **4.2.3.1. Cluster E**

Au sein du cluster des entérovirus appartenant à l'espèce *Enterovirus E*, comprenant les 13 souches présentes dans les échantillons identifiées dans cette espèce et trois souches issues du NCBI appartenant également à cette espèce, on constate que les séquences ont généralement moins de 80 % d'homologie entre elles à l'exception de ces quelques cas particuliers :

- O40232 (N° Biosellal 1600006) et O40233 (N° Biosellal 1600007) partagent 99,7 % d'identité : ces deux échantillons ont été prélevés le même jour au même endroit sur deux bovins différents avec des symptômes similaires (Tableau 13).
- O40842 (N° Biosellal 1600010) et O32931 (N° Biosellal 1600019) partagent 90.8 % d'identité. Les deux échantillons ont été prélevés dans deux localités distantes d'environ 40 kilomètres (Figure 29) à environ 4 années d'intervalle (Tableau 13). La vitesse d'accumulation de mutation n'a pas été calculée par le laboratoire, mais il peut éventuellement s'agir d'une souche proche à presque 4 années d'intervalle.

Parmi ces seize séquences d'entérovirus de l'espèce *Enterovirus E*, O43658 (N° Biosellal 1600015) est celle qui s'éloigne le plus de toutes les autres. Elle se caractérise également par une insertion au début de la séquence de la protéine de la capsid VP1 de 21 nt, répartis en trois inserts de respectivement 6 nt, 6 nt et 9 nt (Figure 35). Cette région précise est également impliquée dans la différenciation des deux espèces d'entérovirus bovins. Cependant le profil d'insertions de O43658 est unique dans les banques de données d'après Biosellal.

#### **4.2.3.2. Cluster F**

Au sein du cluster des entérovirus appartenant à l'espèce *Enterovirus F*, comprenant les trois souches présentes dans les échantillons identifiées dans cette espèce et trois souches issues du site NCBI appartenant également à cette espèce, les pourcentages d'homologie respectifs étalent de 73 %Id à 83 %Id, ces souches sont bien distinctes entre elles.

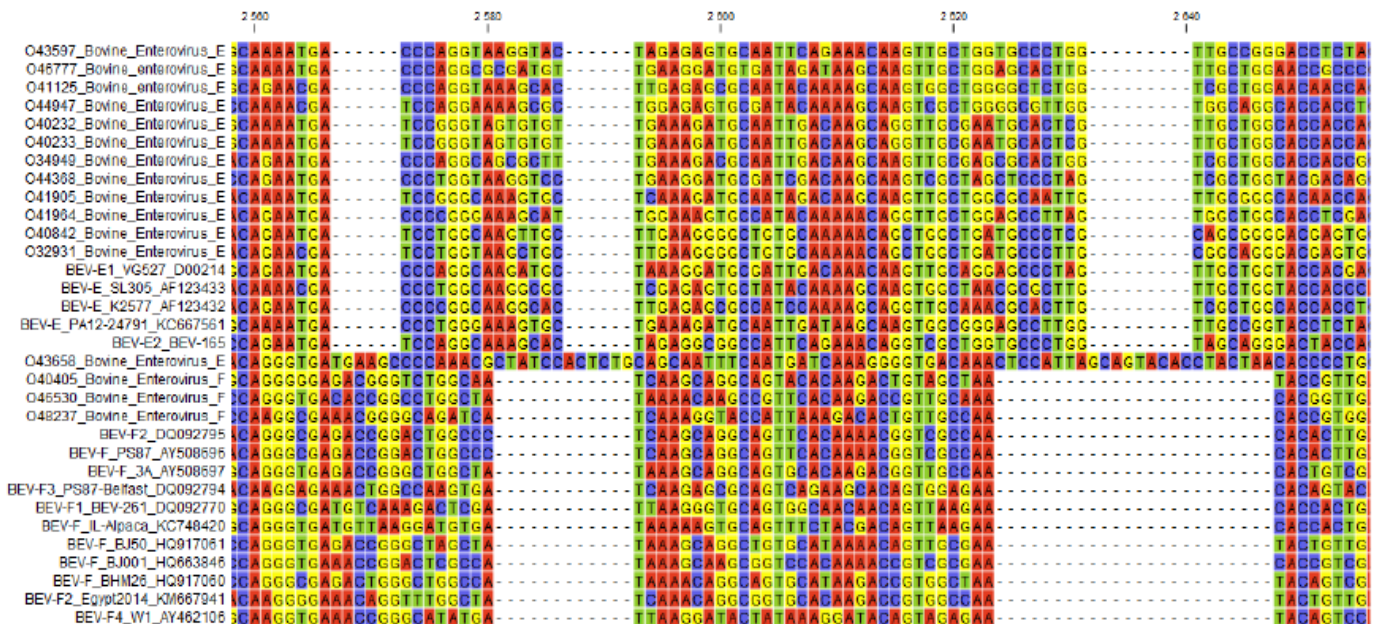
En conclusion sur ces deux clusters, Il n'y a aucune ambiguïté possible sur l'attribution des virus des 16 échantillons aux deux espèces d'entérovirus bovins. Chaque séquence obtenue est différente des séquences déposées au NCBI. Ces virus étant des virus à simple brin d'ARN, une vitesse d'évolution rapide n'est pas étonnante, ce qui explique la forte divergence de %Id intra et inter-clusters.

Les deux séquences qui se distinguent sont :

- O41125 (N° Biosellal 1600011) par une séquence 5'UTR divergente pour les 40 premiers nucléotides. Cette séquence serait cependant à confirmer par une PCR spécifique car un artefact d'assemblage est éventuellement possible à cet endroit précis car il s'agit d'une région palindromique.

- O43658 (N° Biosellal 1600015) par une insertion de 21 nt en 3 points dans la partie N-terminale de la séquence de la protéine VP1 (Figure 35).

**Figure 35 : Détail de la région d'insertion de O43658 (N° Biosellal 1600015) (D'après Biosellal)**

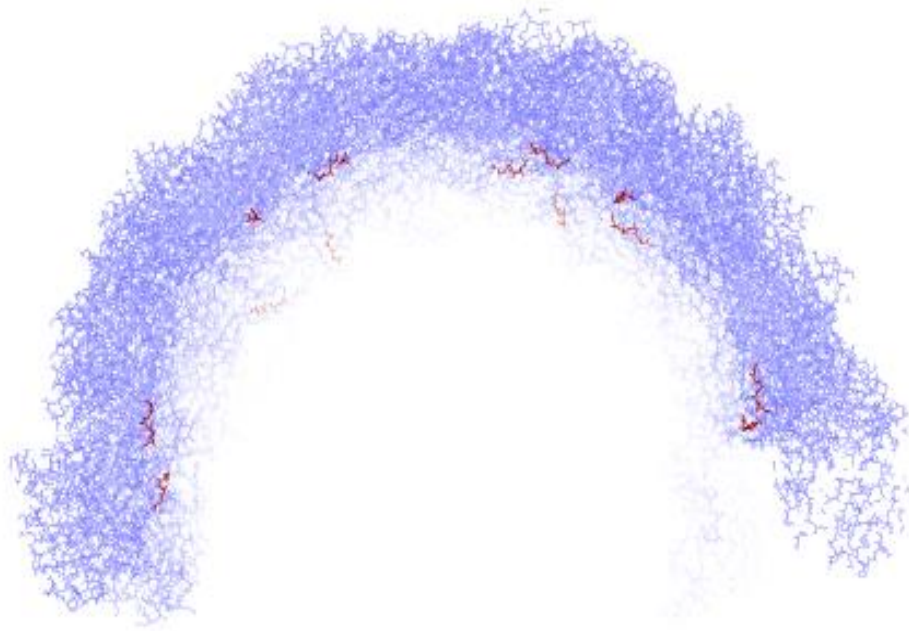


#### 4.2.4. Examen de la structure cristallographique

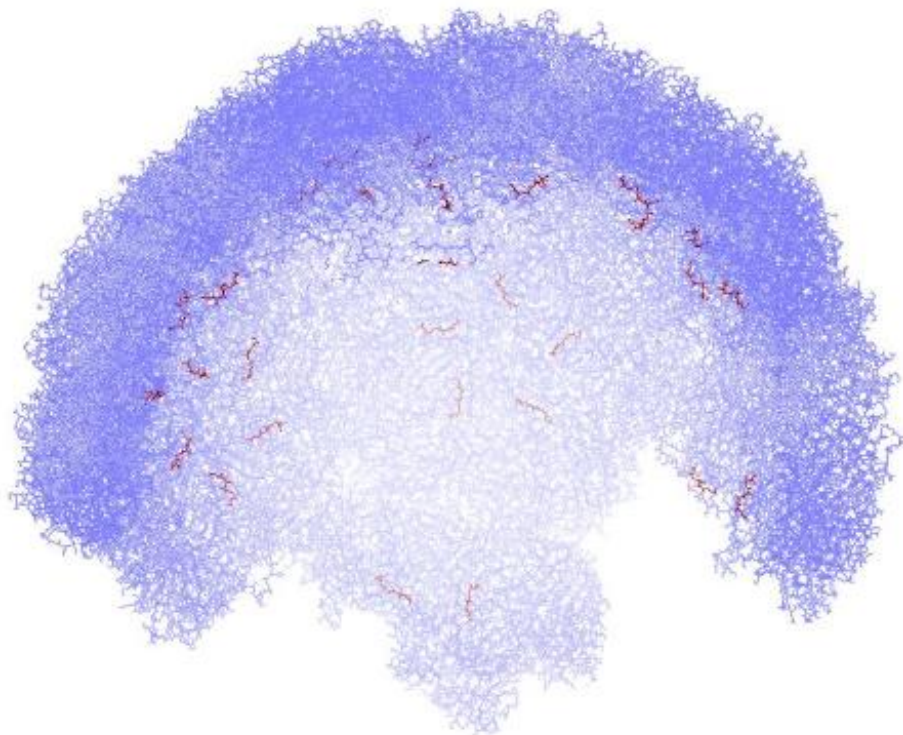
Pour essayer d'évaluer l'impact de cette insertion de 21 nt sur le virus, l'équipe de Biosellal s'est intéressé à la structure de BEV-1 (cf 2.1.2.1. de la partie bibliographique), premier entérovirus bovin découvert et dont la structure a été résolue en 1995 (Smyth *et al.*, 1995) : il en est conclu que ces régions spécifiques de la séquence de la protéine VP1 se trouvent orientées vers l'intérieur du virus, rendant difficile l'évaluation de son impact sur la nature et les propriétés du virus (Figures 36 et 37). Les figures 36 et 37 représentent uniquement BEV-1, sans comparaison avec le virus correspondant à la séquence O43658 (N° Biosellal 1600015).



**Figure 36 : Représentation schématique de la demi-capside de BEV-1 (en bleu) et de la région N-terminale de VP1 (en rouge) : vue en coupe (D'après Biosellal)**



**Figure 37 : Représentation schématique de la demi-capside de BEV-1 (en bleu) et de la région N-terminale de VP1 (en rouge) : vue générale (D'après Biosellal)**





# 5. Discussion

## 5.1. Étude préalable

### 5.1.1. Choix des échantillons

Les 16 échantillons étudiés proviennent donc d'élevages différents mais également de bovins d'âges différents ; ainsi dans cette étude, le jeune bovin présentant des diarrhées représente 56 % des échantillons étudiés et les troubles digestifs, tous âges confondus, représentent 81 % de l'échantillonnage. De la même façon, 90 % des jeunes bovins inclus dans l'étude souffrent de troubles digestifs (Tableau 21).

**Tableau 21 : Synthèse corrélant âge et nature des troubles observés**

*Pourcentages types : (pourcentage du nombre de cas présentant les troubles observés de la catégorie d'âge concerné par rapport au nombre total de cas de la tranche d'âge considérée, pourcentage des cas présentant les troubles observés dans la tranche d'âge considérée par rapport au nombre de cas présentant les troubles observés dans les deux tranches d'âge)*

	Troubles digestifs	Troubles respiratoires	Troubles de la reproduction	Total
Jeunes bovins (<9 mois)	9 (90 %, 70 %)	1 (10%, 100 %)	0 (0 %, 0 %)	10 (100 %, 63 %)
Bovins adultes (>18 mois)	4 (67 %, 30 %)	0 (0 %, 0 %)	2 (33 %, 100 %)	6 (100 %, 37 %)
Total	13 (81 %, 100 %)	1 (6 %, 100 %)	2 (13 %, 100 %)	16 (100 %, 100 %)

De plus, grâce à la figure 29, on peut se rendre compte que 75 % des élevages se trouvent dans un rayon de 40 kilomètres autour d'Arras, ville où se trouve le laboratoire du D' Giraud et que les 25 % restants se situent dans un rayon de 15 km autour de Le Touquet-Paris-Plage, environ 80 km plus à l'Ouest : on peut donc en déduire une assez bonne représentation des élevages du département. Cependant, nous n'avons aucune donnée concernant les élevages que ce soit en termes d'infrastructures, de taille de cheptel, de type de stabulation, de gestion des fumiers et lisiers etc...)

Enfin, la nature des traitements prescrits par les vétérinaires traitants et le nombre de consultations pour chaque bovin inclus dans l'étude ne sont pas connus ; ces données auraient pu être intéressantes notamment pour estimer la mauvaise réponse aux différents traitements.

### 5.1.2. Tests réalisés préalablement au séquençage

De très nombreux tests ont été réalisés sur les échantillons bovins finalement inclus dans l'étude par séquençage nouvelle génération permettant dans la plupart des cas d'exclure les principaux agents responsables habituellement des troubles observés (Tableau 22) ; cependant le degré de recherche n'a pas été le même suivant le bovin testé : par exemple les bovins correspondant aux échantillons Biosellal N° 1600006 et N° 1600007 provenant du même élevage n'ont subi qu'un test bactériologique, sans exploration d'autres causes contrairement au bovin correspondant au N° Biosellal 1600010 ayant subi des tests bactériologiques, virologiques et parasitologiques.

Parmi les cas présentant des troubles digestifs (13 cas) :

- Aucun agent pathogène n'a été retrouvé dans trois cas comprenant justement les N° Biosellal 1600006 et 1600007.
- Quatre cas présentent un voire plusieurs agents pathogènes mais dont la corrélation avec les signes cliniques observés est peu probable : on y retrouve notamment des œufs de *Capillaria* spp. n'induisant presque jamais de signes cliniques chez les bovins (Charlier *et al.*, 2020), des coccidies en quantités très faibles qui ne sont certainement pas impliquées ou bien seulement en partie, un rotavirus induisant une réponse faiblement positive à un test ELISA ce qui limite son implication d'autant plus qu'il est retrouvé chez une vache adulte (N° Biosellal 1600014) et des *Escherichia coli* ETEC (CS31A et FY) qui, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce travail, ne sont que très rarement retrouvés dans les cas de diarrhées chez des veaux de plus d'un mois (Tableau 1) .
- Six cas qui présentent un voire plusieurs agents pathogènes susceptibles d'expliquer les signes observés : plusieurs cas présentent des quantités de coccidies ou de strongles digestifs en quantité moyenne à importante pouvant expliquer l'apparition de diarrhées, un cas d'une vache où *Mycobacterium paratuberculosis*, agent de la paratuberculose, a été diagnostiqué par PCR et le cas du taureau (N° Biosellal 1600021) où *Salmonella* Montevideo a été identifiée après enrichissement, même si la diarrhée décrite ici ne correspond pas aux diarrhées fréquemment rencontrées en cas de salmonellose (*cf.* § 1.3.1.2. de la partie bibliographique).

Enfin, comme décrit dans la première partie de ce travail, l'effet cytopathique caractéristique des entérovirus a permis à l'équipe du Dr Giraud de conserver ces 16 échantillons sous forme de surnageants en attendant le démarrage de cette étude ; l'équipe de Biosellal a cependant décidé, à juste titre, de travailler en aveugle pour que l'étude soit la plus objective possible et puisse mettre en évidence d'autres agents pathogènes qui n'auraient pas été décelés auparavant.

**Tableau 22 : Agents pathogènes retrouvés et corrélation avec les signes cliniques observés dans les 16 échantillons (détail des 13 cas de troubles digestifs uniquement)**

SO : Sans Objet ; ND : Non Développé

N° Biosellal	Bovin concerné	Agent(s) pathogène(s) retrouvé(s)	Corrélation entre la présence de ou des agents et les signes observés
1600009	Veau de quatre mois	Œufs de <i>Capillaria</i> spp. en quantité moyenne, rares coccidies	Très peu probable
1600006	Veau de huit mois	Aucun	SO
1600007	Veau de huit mois	Aucun	SO
1600008	Veau de six mois	<i>Escherichia coli</i> CS31A + rares coccidies	Peu probable
1600010	Veau de quatre mois	<i>Escherichia coli</i> FY + rares œufs de <i>Strongyloides</i> spp., coccidies en quantité moyenne	Possible
1600011	Génisse de 18 mois	Coccidies en quantité moyenne	Possible
1600012	Vache	Aucun	Sans objet
1600013	Vache	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Très probable
1600014	Vache	Rotavirus (incertain)	Très peu probable
1600015	Veau de cinq mois	<i>Pasteurella multocida</i>	ND
1600016	Veau	Aucun	SO
1600017	Vache	BoHV-4	ND
1600018	Veau de neuf mois	Œufs de strongles en quantité moyenne, coccidies en quantité importante	Très probable
1600019	Vache	Aucun	ND
1600020	Veau	rares coccidies	Très peu probable
1600021	Taureau	<i>Salmonella</i> Montevideo après enrichissement	Possible

## 5.2. Phase de criblage

### 5.2.1. Préparation des échantillons

Le laboratoire Biosellal a bien spécifié qu'un protocole d'extraction se démarquait des autres : le protocole D2. Celui-ci a l'avantage de très bien fonctionner sur des virus à ARN par le simple fait que tout le matériel génétique de l'échantillon est digéré par les DNAses et les RNAses sauf celui du virus, protégé par sa capsid ; de plus, l'étape de RT est fondamentale sur ces virus à ARN.

L'efficacité de ce protocole se reflète également sur le taux de séquences nettoyées : en effet, si on calcule le pourcentage de séquences après nettoyage (séquences nettoyées) par rapport à la totalité des séquences au départ (séquences brutes), on se rend compte que les autres protocoles (B, C et D1) ont des pourcentages beaucoup plus faibles ( 0,3 % pour D1, 0,06 % pour C et 0,03 % pour B) que celui de D2 (2 %) : cela montre que le protocole D2 permet d'identifier beaucoup moins de séquences brutes que les autres protocoles mais ces séquences ont moins de chances d'être écartées après l'étape de nettoyage. La représentativité des séquences est donc accrue.

### 5.2.2. Analyse

La technologie Illumina® est celle qui a le meilleur rendement sur le marché concernant le séquençage nouvelle génération mais elle a un désavantage majeur : lors de la formation de la banque bio-informatique, un taux non négligeable d'erreur d'assignements des codes-barres a été identifié ; cet inconvénient peut engendrer des contaminations entre échantillons faisant partie du même cycle de séquençage (Gu *et al.*, 2019). C'est pour cette raison que l'équipe de Biosellal voulait s'assurer que les séquences de bactéries et de bactériophages identifiées dans les échantillons n'étaient pas retrouvées dans les échantillons de l'autre projet présent dans le même cycle de séquençage. De plus, les bactéries du genre *Pseudomonas*, au même titre que d'autres bactéries, sont souvent retrouvées en tant qu'agents de contamination lors de la réalisation d'un NGS (Laurence *et al.*, 2014).

L'hypothèse principale de contamination des échantillons serait donc une contamination au sein du laboratoire du D<sup>r</sup> Giraud : il s'agirait probablement de restes de contaminants non viables.

### 5.3. Affinage du séquençage

Dans le tableau 20, on remarque que l'équipe du laboratoire Biosellal a utilisé le critère de 70 % d'homologie entre les séquences, recommandations actuelles de l'ICTV, pour classer les entérovirus bovins identifiés dans les échantillons dans les deux espèces d'entérovirus bovins reconnues à ce jour (*Enterovirus E* et *Enterovirus F*) (cf. § 2.1.1.2.). La présence d'un ancêtre commun (nœud au niveau d'un arbre phylogénétique) est également un critère utilisé par le laboratoire pour classer ces virus au sein des deux espèces. Le classement des virus au sein des sérotypes de chaque espèce n'a cependant pas été effectué ; une étude taxonomique plus poussée est nécessaire et permettrait peut-être de définir d'autres sérotypes d'entérovirus bovins.

Les séquences particulières identifiées par le laboratoire aux extrémités des régions N-terminales de ces virus sont très probablement les séquences formant les poches hydrophobes autour des sites de fixation des « *pocket factor* » (cf. § 2.1.2.2.1.) : cela expliquerait le fait qu'une grosse divergence soit retrouvée entre les différents virus puisqu'il s'agit d'une zone caractéristique de chaque entérovirus. Le fait d'obtenir une séquence très éloignée des autres virus pour celui correspondant au N° Biosellal 1600015 pourrait également indiquer la potentielle découverte d'un nouveau sérotype au sein des espèces d'entérovirus bovins connues aujourd'hui.



# Conclusion

---

Les diarrhées chez le veau constituent encore aujourd'hui une dominante pathologique majeure dans les élevages et peuvent être causées par un très grand nombre d'agents pathogènes comme des bactéries, des virus ou des parasites. Ces agents peuvent intervenir très tôt dans la vie de l'animal et causent très souvent l'apparition de signes non spécifiques nécessitant une investigation plus poussée pour poser un diagnostic précis. Dans la grande majorité des cas, ces syndromes diarrhéiques sont causés par plusieurs agents pathogènes pouvant appartenir à des classes complètement différentes, compliquant ainsi l'établissement d'un lien de causalité entre un agent et la pathologie rencontrée.

Les entérovirus bovins, peu étudiés jusqu'aujourd'hui, ont été identifiés dans plusieurs cas de syndrome diarrhéique depuis les années 1950 mais leur implication n'a jamais été formellement établie d'autant plus que ce sont des virus très résistants qui sont retrouvés très fréquemment dans l'environnement et qui sont plus souvent identifiés chez des bovins cliniquement sains que chez des bovins présentant des signes cliniques. L'établissement des postulats de Koch et des critères de Hill reste donc, dans les cas des infections aux entérovirus bovins, très difficile.

L'étude menée par le laboratoire Biosellal à la demande du Dr Giraud a réussi à identifier, grâce à des outils technologiques très récents et très performants pour séquencer des génomes, pas moins de 15 entérovirus bovins différents dans 16 échantillons de terrain, majoritairement prélevés sur des bovins souffrant de diarrhées. L'étude phylogénétique et moléculaire qui en découle a bien montré que ces virus appartenaient tous à une des deux espèces reconnues aujourd'hui d'entérovirus bovins (*Enterovirus E* et *Enterovirus F*) même si une étude plus poussée aurait peut-être permis de les classer au sein des différents sérotypes de chaque espèce, voire même dans de nouveaux sérotypes. Cependant, grâce à l'étude bibliographique menée dans la première partie de ce travail, il semble difficile d'incriminer uniquement ces virus dans les affections rencontrées sur le terrain puisque d'une part ces virus sont omniprésents dans les cheptels bovins et retrouvés très souvent chez des bovins cliniquement sains et d'autre part l'investigation qui précède le séquençage nouvelle génération n'a pas été aussi poussée pour tous les échantillons, laissant planer le doute sur une potentielle implication d'autres agents pathogènes.

La réalisation d'autres études de ce type sur les entérovirus bovins en France, plus abordables aujourd'hui avec la standardisation du séquençage nouvelle génération, permettrait d'évaluer la prévalence de ces virus mais aussi de confirmer ou d'infirmer leur implication dans les syndromes diarrhéiques du veau. Ces études supplémentaires permettraient également de mieux comprendre la physiopathologie de ces virus qui pourraient être des pathogènes primaires de la maladie constatée en l'absence d'agents pathogènes classiquement rencontrés ou alors des agents de co-infection aggravant la maladie.



# Liste des références bibliographiques

---

- ANDERSEN A.A. (1978) Cross reaction between bovine enterovirus and South African Territories 15 foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 39(1), 59-63
- ASOKAN G.V., ASOKAN V. (2016) Bradford Hill's criteria, emerging zoonoses, and One Health. *J. Epidemiol. Glob. Health* 6(3), 125-129
- BAGGEN J., THIBAUT H.J., STRATING J.R.P.M., VAN KUPPEVELD F.J.M. (2018) The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* 16(6), 368-381
- BEATO M.S., MARCACCI M., SCHIAVON E., *et al.* (2018) Identification and genetic characterization of bovine enterovirus by combination of two next generation sequencing platforms. *J. Virol. Methods* 260, 21-25
- BELBIS G. (2017) Les entérites néonatales non parasitaires du veau. Gestion de la santé des ruminants. Cours. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de pathologie des animaux de production.
- BESSAUD M., BLONDEL B., JOFFRET M.-L., KAIN A.M., DELPEYROUX F. (2018) Nomenclature et classification des entérovirus : quelle histoire ! *Virologie* 22(6), 289-303
- BIRDANE F.M., GÜR S. (2019) Precolostral evaluation of Bovine Enterovirus Type 1 (BEV1) infection in a dairy herd. *Vet. Arh.* 89, 1-10
- BLAGA R. (2016) Coccidioses et cryptosporidioses. Infectiologie clinique. Cours. Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort, Unité pédagogique de parasitologie.
- BLAS-MACHADO U., SALIKI J.T., BOILEAU M.J., *et al.* (2007) Fatal ulcerative and hemorrhagic typhlocolitis in a pregnant heifer associated with natural bovine enterovirus type-1 infection. *Vet. Pathol.* 44(1), 110-115
- BLAS-MACHADO U., SALIKI J.T., SÁNCHEZ S., *et al.* (2011) Pathogenesis of a bovine enterovirus-1 isolate in experimentally infected calves. *Vet. Pathol.* 48(6), 1075-1084
- BOILEAU M.J., KAPIL S. (2010) Bovine Coronavirus Associated Syndromes. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26(1), 123-146
- CANDIDO M., ALMEIDA-QUEIROZ S.R., BUZINARO M.G., *et al.* (2019) Detection and molecular characterisation of bovine Enterovirus in Brazil: four decades since the first report. *Epidemiol. Infect.* 147
- CHAMBON M., ARCHIMBAUD C., BAILLY J.L., *et al.* (2001) Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *J. Med. Virol.* 65(2), 340-347
- CHARLIER J., HÖGLUND J., MORGAN E.R., *et al.* (2020) Biology and Epidemiology of Gastrointestinal Nematodes in Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 36(1), 1-15
- CHO Y.-I., HAN J.-I., WANG C., *et al.* (2013) Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Vet. Microbiol.* 166(3), 375-385
- CHO Y., YOON K.-J. (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 15(1), 1-17
- CRAIG T.M. (2018) Gastrointestinal Nematodes, Diagnosis and Control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34(1), 185-199
- CROXEN M.A., FINLAY B.B. (2010) Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(1), 26-38
- DE JONG H., EKDAHL M.O. (1965) Salmonellosis in calves--the effect of dose rate and other factors on transmission. *N. Z. Vet. J.* 13(3), 59-64
- DERBYSHIRE J.B., BROWN E.G. (1979) The inactivation of viruses in cattle and pig slurry by aeration or treatment with calcium hydroxide. *J. Hyg. (Lond.)* 82(2), 293-299
- DIAZ-SAN SEGUNDO F., MEDINA G.N., STENFELDT C., ARZT J., DE LOS SANTOS T. (2017) Foot-and-mouth disease vaccines. *Vet. Microbiol.* 206, 102-112
- DIVERS T.J., PEEK S.F. (2008) Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. In *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 2<sup>nd</sup> Edition. St Louis, Elsevier, pp 200-228
- DU J., LU L., LIU F., *et al.* (2016) Distribution and characteristics of rodent picornaviruses in China. *Sci. Rep.* 6, 34381



- DUNNE H.W., HUANG C.M., LIN W.J. (1974) Bovine enteroviruses in the calf: an attempt at serologic, biologic, and pathologic classification. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 164(3), 290-294
- FRANCOZ D., NICHOLS S., SCHELCHER F. (2017) Les maladies du système digestif. *In Guide pratique des maladies du veau.* Paris, Med'Com, pp 169-201
- GILLIER S. (2013) Comparaison de deux méthodes d'extraction d'ARN pour identifier des marqueurs précoces de gestation chez les ruminants. Thèse Méd. Vét., Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.
- GOENS S.D., BOTERO S., ZEMLA A., ZHOU C.E., PERDUE M.L. (2004) Bovine enterovirus 2: complete genomic sequence and molecular modelling of a reference strain and a wild-type isolate from endemically infected US cattle. *J. Gen. Virol.* 85(Pt 11), 3195-3203
- GOMEZ D.E., WEESE J.S. (2017) Viral enteritis in calves. *Can. Vet. J.* 58(12), 1267-1274
- GU W., MILLER S., CHIU C.Y. (2019) Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu. Rev. Pathol.* 14, 319-338
- HE H., TANG C., CHEN X., *et al.* (2017) Isolation and characterization of a new enterovirus F in yak feces in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Arch. Virol.* 162(2), 523-527
- HELLER M.C., CHIGERWE M. (2018) Diagnosis and Treatment of Infectious Enteritis in Neonatal and Juvenile Ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34(1), 101-117
- HODNIK J.J., JEŽEK J., STARIČ J. (2020) Coronaviruses in cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* , 1-8
- HÖFNER M.C., CARPENTER W.C., LYONS S.A., HAMBLIN C. (1993) An indirect sandwich ELISA for the identification of bovine enteroviruses. *J. Virol. Methods* 41(2), 239-243
- HOLLAND R.E., WILSON R.A., HOLLAND M.S., *et al.* (1999) Characterization of eae+Escherichia coli isolated from healthy and diarrheic calves. *Vet. Microbiol.* 66(4), 251-263
- HOLSCHBACH C.L., PEEK S.F. (2018) Salmonella in Dairy Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34(1), 133-154
- HORSINGTON J., LYNCH S.E., GILKERSON J.R., STUDDERT M.J., HARTLEY C.A. (2013) Equine picornaviruses: well known but poorly understood. *Vet. Microbiol.* 167(1-2), 78-85
- HOSAINZADEGAN H., KHALILOV R., GHOLIZADEH P. (2020) The necessity to revise Koch's postulates and its application to infectious and non-infectious diseases: a mini-review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39(2), 215-218
- HUGHES L.E., RYAN M.D. (2008) Enteroviruses of Animals. *In Encyclopedia of Virology*, 3<sup>rd</sup> Edition. Amsterdam, Academic press ltd - Elsevier science ltd, pp 123-129
- ILIE M., LONG É., HOFMAN V., *et al.* (2014) Les méthodes de séquençage de « nouvelle génération » (NGS) et le cancer broncho-pulmonaire: principales technologies, applications et limites actuelles en pathologie. *Anat. Cytol. Pathol.* n°458, 51-58
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) (2020) Genus : Enterovirus. *In The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature.* [[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus)] (consulté le 30/08/2020).
- IZZO M., KIRKLAND P., MOHLER V., *et al.* (2011) Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 89(5), 167-173
- JANKE B.H., FRANCIS D.H., COLLINS J.E., *et al.* (1990) Attaching and effacing Escherichia coli infection as a cause of diarrhea in young calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196(6), 897-901
- JEOUNG H.-Y., LIM J.-A., JEONG W., OEM J.-K., AN D.-J. (2011) Three clusters of bovine kobuvirus isolated in Korea, 2008–2010. *Virus Genes* 42(3), 402-406
- JIMÉNEZ-CLAVERO M.A., ESCRIBANO-ROMERO E., MANSILLA C., *et al.* (2005) Survey of Bovine Enterovirus in Biological and Environmental Samples by a Highly Sensitive Real-Time Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7), 3536-3543
- JINDAL S.K. (2018) Koch's postulates - Pitfalls and relevance in the 21st century. *Indian J. Tuberc.* 65(1), 6-7
- KEETON S.T.N., NAVARRE C.B. (2018) Coccidiosis in Large and Small Ruminants. *Dig. Disord. Abomasum Intest.* 34(1), 201-208
- KHODAKARAM-TAFTI A., FARJANIKISH GH. (2017) Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iran. J. Vet. Res.* 18(3), 154-163

- KIM H.-C., CHOE C., KIM S., *et al.* (2018) Epidemiological Survey on Eimeria spp. Associated with Diarrhea in Pre-weaned Native Korean Calves. *Korean J. Parasitol.* 56(6), 619-623
- KNOWLES N.J., BARNETT I.T. (1985) A serological classification of bovine enteroviruses. *Arch. Virol.* 83(3-4), 141-155
- KNOWLES N.J., MANN J.A. (1990) Bovine Enteroviruses. *In Virus Infections of Ruminants*. Uppsala, Elsevier, pp 513-516
- KOIKE S., HORIE H., ISE I., *et al.* (1990) The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J.* 9(10), 3217-3224
- KOOPMANS M., VAN WUIJCKHUISE-SJOUKE L., SCHUKKEN Y.H., CREMERS H., HORZINEK M.C. (1991) Association of diarrhea in cattle with torovirus infections on farms. *Am. J. Vet. Res.* 52(11), 1769-1773
- LAFONT R. (2021) Techniques de dosage. *In Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules.* [<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>] (consulté le 10/01/2021).
- LAURENCE M., HATZIS C., BRASH D.E. (2014) Common Contaminants in Next-Generation Sequencing That Hinder Discovery of Low-Abundance Microbes. *PLoS One* 9(5), 1-8
- LEY V., HIGGINS J., FAYER R. (2002) Bovine Enteroviruses as Indicators of Fecal Contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(7), 3455-3461
- LI L.L., LIU N., HUMPHRIES E.M., *et al.* (2016) Aetiology of diarrhoeal disease and evaluation of viral-bacterial coinfection in children under 5 years old in China: a matched case-control study. *Clin. Microbiol. Infect.* 22(4), 381.e9-381.e16
- LIAO P., SATTEN G.A., HU Y.-J. (2017) PhredEM: A Phred-Score-Informed Genotype-Calling Approach for Next-Generation Sequencing Studies. *Genet. Epidemiol.* 41(5), 375-387
- LIN W.-Y., YU Y.-J., JINN T.-R. (2019) Evaluation of the virucidal effects of rosmarinic acid against enterovirus 71 infection via in vitro and in vivo study. *Virology* 16(1), 94
- LULLA V., DINAN A.M., HOSMILLO M., *et al.* (2019) An Upstream Protein-Coding Region in Enteroviruses Modulates Virus Infection in Gut Epithelial Cells. *Nat. Microbiol.* 4(2), 280-292
- MCCLENAHAN S.D., SCHERBA G., BORST L., *et al.* (2013) Discovery of a Bovine Enterovirus in Alpaca. *PLoS One* 8(8), e68777
- MOKILI J.L., ROHWER F., DUTILH B.E. (2012) Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr. Opin. Virol.* 2(1), 63-77
- MOLL T., FINLAYSON A.V. (1957) Isolation of cytopathogenic viral agent from feces of cattle. *Science* 126(3270), 401-402
- MOXLEY R.A., SMITH D.R. (2010) Attaching-effacing Escherichia coli Infections in Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26(1), 29-56
- NOLLENS H.H., RIVERA R., PALACIOS G., *et al.* (2009) Short Communication: New Recognition Of Enterovirus Infections In Bottlenose Dolphins (*Tursiops Truncatus*). *Vet. Microbiol.* 139(0), 170-175
- OLIJVE L., JENNINGS L., WALLS T. (2017) Human Parechovirus: an Increasingly Recognized Cause of Sepsis-Like Illness in Young Infants. *Clin. Microbiol. Rev.* 31(1), 3-6
- PEARSON G.R., BAZELEY K.J., JONES J.R., *et al.* (1999) Attaching and effacing lesions in the large intestine of an eight-month-old heifer associated with Escherichia coli O26 infection in a group of animals with dysentery. *Vet. Rec.* 145(13), 370-373
- PEEK S.F., MCGUIRK S.M., SWEENEY R.W., CUMMINGS K.J. (2018) Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. *In Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 2<sup>nd</sup> Edition. St Louis, Elsevier, pp 249-356
- RAHMANI F., HMAIED F., MATEI I., *et al.* (2020) Occurrence of Staphylococcus spp. and investigation of fecal and animal viral contaminations in livestock, river water, and sewage from Tunisia and Romania. *Environ. Monit. Assess.* 192(4), 206
- REGALLA J. (1995) [Complement fixation reaction for the serologic diagnosis of bovine contagious pleuropneumonia: application and interpretation of the results]. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 14(3), 631-644
- REN X., ZHANG S., GAO X., *et al.* (2020) Experimental immunization of mice with a recombinant bovine enterovirus vaccine expressing BVDV E0 protein elicits a long-lasting serologic response. *Virology* 17(1), DOI: 10.1186/s12985-020-01338-6

- ROEDIG P., GINN H.M., PAKENDORF T., *et al.* (2017) High-speed fixed-target serial virus crystallography. *Nat. Methods* 14(8), 805-810
- ROOD J.I., ADAMS V., LACEY J., *et al.* (2018) Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 53, 5-10
- SANTIN M. (2020) Cryptosporidium and Giardia in Ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 36(1), 223-238
- SCHULZE F. (1992) [Campylobacter as the cause of diarrhea in calves]. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 99(11), 458-461
- SHAN T., LI L., SIMMONDS P., *et al.* (2011) The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm. *J. Virol.* 85(22), 11697-11708
- SHARP C.P., GREGORY W.F., MASON C., BRONSVOORT B.M. deC, BEARD P.M. (2015) High prevalence and diversity of bovine astroviruses in the faeces of healthy and diarrhoeic calves in South West Scotland. *Vet. Microbiol.* 178(1), 70-76
- SIMMONDS P., GORBALENYA A.E., HARVALA H., *et al.* (2020) Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch. Virol.* 165(3), 793-797
- SLOVIS N.M., ELAM J., ESTRADA M., LEUTENEGGER C.M. (2014) Infectious agents associated with diarrhoea in neonatal foals in central Kentucky: a comprehensive molecular study. *Equine Vet. J.* 46(3), 311-316
- SMYTH M., TATE J., HOEY E., *et al.* (1995) Implications for viral uncoating from the structure of bovine enterovirus. *Nat. Struct. Biol.* 2(3), 224-231
- SMYTH M., SYMONDS A., BRAZINOVA S., MARTIN J. (2002) Bovine enterovirus as an oncolytic virus: foetal calf serum facilitates its infection of human cells. *Int. J. Mol. Med.* 10(1), 49-53
- SMYTH M., PETTITT T., SYMONDS A., MARTIN J. (2003) Identification of the pocket factors in a picornavirus. *Arch. Virol.* 148(6), 1225-1233
- TAKAHASHI S., HASAN M.A., ITO M., *et al.* (2020) Regression of viral pathogen indicators due to improvement of hygiene protocols on boots in a bovine farm. *J. Vet. Med. Sci.* 82(12), 1793-1797
- TAYLOR M.W., SU R., CORDELL-STEWART B., *et al.* (1974) Bovine enterovirus-1: characterization, replication and cytopathogenic effects. *J. Gen. Virol.* 23(2), 173-178
- TSUCHIYAKA S., RAHPAYA S.S., OTOMARU K., *et al.* (2017) Identification of a novel bovine enterovirus possessing highly divergent amino acid sequences in capsid protein. *BMC Microbiol.* 17, DOI: 10.1186/s12866-016-0923-0
- VAN DER POEL W.H.M., VAN DER HEIDE R., VERSCHOOR F., *et al.* (2003) Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* 92(4), 297-309
- VENJAKOB P.L., THIELE G., CLAUSEN P.-H., NIJHOF A.M. (2017) *Toxocara vitulorum* infection in German beef cattle. *Parasitol. Res.* 116(3), 1085-1088
- VOGT D.A., ANDINO R. (2010) An RNA Element at the 5'-End of the Poliovirus Genome Functions as a General Promoter for RNA Synthesis. *PLoS Pathog.* 6(6), 1-11
- WADA Y., NAKAZAWA M., KUBO M. (1994) Natural infection with attaching and effacing *Escherichia coli* (O15) in an adult cow. *J. Vet. Med. Sci.* 56(1), 151-152
- WANG M., HE J., LU H., *et al.* (2017) A novel enterovirus species identified from severe diarrheal goats. *PLoS One* 12(4), 12-27
- WELDON S.L., BLUE J.L., WOOLEY R.E., LUKERT P.D. (1979) Isolation of picornavirus from feces and semen from an infertile bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174(2), 168-169
- WOO P.C.Y., LAU S.K.P., LI T., *et al.* (2015) A novel dromedary camel enterovirus in the family Picornaviridae from dromedaries in the Middle East. *J. Gen. Virol.* 96(Pt 7), 1723-1731
- YAMADA M., KUBOTA K., TAKAHASHI S., *et al.* (2020) Longitudinal and cross-sectional detection of four bovine enteric viruses by multiplex- reverse transcription polymerase chain reaction: Identification of possible indicator viruses to assess biosecurity level at bovine farms. *J. Vet. Med. Sci.* 82(3), 314-319
- YI E.-J., SHIN Y.-J., KIM J.-H., KIM T.-G., CHANG S.-Y. (2017) Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 6(1), 4-14
- ZELL R., DELWART E., GORBALENYA A.E., *et al.* (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 98(10), 2421-2422

- ZHANG A.Q., SMITH J.R., BURGESS G.W. (1990) Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against bovine enterovirus. *Vet. Microbiol.* 21(3), 275-281
- ZHANG H., LIU H., BAO J., *et al.* (2014) Characterization of an Enterovirus species E isolated from naturally infected bovine in China. *Virus Res.* 191, 101-107
- ZHENG T. (2007) Characterisation of two enteroviruses isolated from Australian brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand. *Arch. Virol.* 152(1), 191-198
- ZHU L., XING Z., GAI X., *et al.* (2014) Identification of a Novel Enterovirus E Isolates HY12 from Cattle with Severe Respiratory and Enteric Diseases. *PLoS One* 9(5), 1-15
- ZHU T., ZHAO G., SHEN F., *et al.* (2015) [Establishment and Preliminary Application of the SYBR Green I Real-time PCR Assay for Detection of the Bovine Enterovirus]. *Bing Xue Bao Chin. J. Virol.* 31(5), 488-493



# IMPLICATION DES ENTÉROVIRUS BOVINS DANS LES DIARRHÉES DU VEAU: ÉTUDE D'ÉCHANTILLONS PAR SÉQUENÇAGE NOUVELLE GÉNÉRATION

---

**AUTEUR : Alexandre FEVAL**

## **RÉSUMÉ :**

Les diarrhées chez le veau constituent la plus grande dominante pathologique dans les cheptels bovins et causent des pertes économiques majeures dans les élevages du monde entier. Celles-ci sont d'origine infectieuse, pouvant être causées par des bactéries, des virus ou encore des parasites, ou non-infectieuse incluant essentiellement des causes alimentaires. L'étiologie des diarrhées chez le veau est dans la très grande majorité des cas multifactorielle ce qui complique l'établissement des postulats de Koch et des critères de Hill, fondamentaux pour permettre d'associer une cause à une pathologie.

Les entérovirus bovins, virus de la famille des *Picornaviridae*, sont de petits virus à ARN très résistants dans l'environnement omniprésents dans les élevages bovins et dans l'environnement qui font partie des potentielles causes de diarrhées chez le veau. Très peu de choses sont connues sur ces virus et ils sont très souvent considérés comme peu virulents et identifiés chez de très nombreux bovins cliniquement sains. Cependant plusieurs cas de diarrhées où ces virus ont été identifiés ont été recensés depuis leur découverte dans les années 1950.

Une étude menée dans la Pas-De-Calais sur 16 bovins présentant dans la majorité des cas des diarrhées chroniques a permis l'identification de 15 entérovirus bovins appartenant aux deux espèces d'entérovirus bovins reconnues aujourd'hui (*Enterovirus E* et *Enterovirus F*) par séquençage nouvelle génération. Il est cependant difficile d'incriminer complètement et uniquement ces virus dans les affections retrouvées sur le terrain.

## **MOTS CLÉS :**

DIARRHÉE, ENTÉROVIRUS, SÉQUENÇAGE, ÉCHANTILLON, CO-INFECTION, BOVIN, VEAU.

## **JURY :**

Président : Pr Jean-Philippe BASTARD

1<sup>er</sup> Assesseur : Pr Yves MILLEMANN

2<sup>nd</sup> Assesseur : Pr Sophie LE PODER

# INVOLVEMENT OF BOVINE ENTEROVIRUS IN CALF SCOURS, A STUDY ON SAMPLES WITH NEW GENERATION SEQUENCING

---

**AUTHOR:** Alexandre FEVAL

## **SUMMARY:**

Calf scours account for the most prevailing disorder in cattle breeding, entailing major economic losses in the world. They can be either infectious diseases, due to bacteria, virus or parasites, or non-infectious diseases, mainly foodborne. Calf scours' etiology is most of the time multifactor, which complicates the verifying of Koch's postulates and Hill's criteria that is essential to be able to associate one cause with one condition.

Bovine enterovirus, belonging to the *Picornaviridae* family, is a small ARN virus that is highly resistant and ubiquitous in the environment, particularly in bovine farms where it is potentially involved in calf scours. Little information is available but it is often considered as lowly virulent, being identified in many clinically sound bovine animals. However, since it has been discovered in the 1950s, several cases of diarrhea have been reported where this virus was identified.

A study taking place in the department of Pas-de Calais in the North of France on 16 head of cattle with mainly chronic diarrhea, identified 15 enterovirus belonging to the 2 major families currently acknowledged (Enterovirus E or F), thanks to new generation sequencing. Nevertheless, it is difficult to fully and only involve this virus in the diseases identified on-farm.

## **KEYWORDS:**

SCOURS, ENTEROVIRUS, SEQUENCING, COINFECTION, CATTLE, CALF.

## **JURY:**

Chairperson: Pr Jean-Philippe BASTARD

1<sup>st</sup> Assessor: Pr Yves MILLEMANN

2<sup>nd</sup> Assessor: Pr Sophie LE PODER