



HAL
open science

Approches innovantes pour la détection des agents pathogènes viraux de l'appareil respiratoire des bovins

Lise Bardou

► **To cite this version:**

Lise Bardou. Approches innovantes pour la détection des agents pathogènes viraux de l'appareil respiratoire des bovins. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04879750

HAL Id: dumas-04879750

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04879750v1>

Submitted on 10 Jan 2025

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.

APPROCHES INNOVANTES POUR LA DETECTION DES AGENTS PATHOGENES VIRAUX DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE DES BOVINS

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

BARDOU Lise, Armelle

Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :

M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Gilles FOUCRAS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Hervé CASSARD

Ingénieur de recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

APPROCHES INNOVANTES POUR LA DETECTION DES AGENTS PATHOGENES VIRAUX DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE DES BOVINS

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

BARDOU Lise, Armelle

Née le 27/03/1998 à BEZIERS (34)

Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :

M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Gilles FOUCRAS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Hervé CASSARD

Ingénieur de recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

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

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

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

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

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

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

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

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

À Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie infectieuse

Merci d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

À Monsieur le Professeur Gilles Foucras

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des ruminants

Merci de m'avoir proposé de prendre part à ce projet. Merci également pour votre encadrement et votre aide précieuse dans la rédaction de ce manuscrit. Par ailleurs, merci pour vos enseignements en Pathologie des ruminants.

À Monsieur le Docteur Hervé Cassard

Ingénieur de recherche à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Praticien hospitalier
Pathologie des ruminants

Merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse. Merci également pour vos enseignements pratiques en Pathologie des ruminants.

À Monsieur le Docteur Jean-Maxime Roux

Ingénieur et chercheur au Centre d'étude du CEA de Grenoble
Microtechnologies pour la Biologie et la Santé

Merci infiniment de m'avoir accordé votre confiance pour participer à ce projet. Merci également pour votre gentillesse mais aussi pour m'avoir intégrée à votre équipe de recherche qui s'est révélée être aussi bienveillante que vous. Je vous remercie enfin pour votre aide dans la mise en place du projet, la réalisation des expérimentations mais aussi pour la rédaction du manuscrit.

À Monsieur l'Ingénieur Guillaume Blaire

Ingénieur au Centre d'étude du CEA de Grenoble

Laboratoire de Systèmes Microfluidiques et de Biotechnologies

Merci infiniment pour votre gentillesse et pour votre aide lors de la réalisation des expérimentations. Je vous remercie enfin pour votre aide à la rédaction du manuscrit.

À Madame l'Ingénieure d'études Marine Milhes

Ingénieure d'étude à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunité et ALternatives aux Antibiotiques (IALTA)

Merci pour votre bienveillance et pour m'avoir intégrée aux manipulations pour les analyses biomoléculaires au laboratoire. Je vous remercie enfin pour votre aide dans la mise en place des protocoles, la réalisation des analyses et l'interprétation des résultats.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ANNEXES.....	6
TABLE DES FIGURES.....	6
TABLE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	10
INTRODUCTION GÉNÉRALE	12
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE INTRODUCTIVE	15
<i>I. Collecte d'échantillons respiratoires sur animal vivant : inventaire des méthodes actuelles.....</i>	15
1. Conditions préalables au prélèvement.....	15
2. L'écouvillonnage nasal (EN) et l'écouvillonnage nasopharyngé profond (ENP).....	16
2.1. Matériel.....	16
2.2. Réalisation.....	17
2.3. Conditionnement de l'échantillon.....	19
2.4. Avantages et inconvénients.....	19
3. L'aspiration trans-trachéale (ATT)	20
3.1. Matériel.....	21
3.2. Réalisation.....	21
3.3. Conditionnement de l'échantillon.....	23
3.4. Avantages et inconvénients.....	24
4. Lavage broncho-alvéolaire (LBA)	24
4.1. Matériel.....	25
4.2. Réalisation.....	25
4.3. Conditionnement de l'échantillon.....	27
4.4. Avantages et inconvénients.....	28
5. Comparaison entre les méthodes.....	29
<i>II. Méthodes de détection virale en routine.....</i>	31
1. Isolement viral	31
2. Test immuno-enzymatique (ELISA)	32

3. Méthodes d'amplification moléculaire	32
3.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	33
3.2. Amplification isotherme médiée par des boucles (LAMP)	35
III. Modalités de transmission virale par voie aérienne	36
1. Définition d'un bioaérosol respiratoire	36
1.1. Définition	36
1.2. Taille	36
1.3. Composition	37
2. Transmission virale par voie aérienne	37
2.1. Phase de séchage	38
2.2. Phase de sédimentation	39
2.3. Survie virale	40
2.4. Efficacité de la transmission	42
3. Inhalation d'aérosols chargés en virus	43
IV. Méthodes actuelles appliquées à la collecte virale dans l'air et combinaison avec les méthodes de détection ultérieures	44
1. Enjeux de la collecte virale en suspension dans l'air	44
2. Collecteurs à inertie	45
2.1. Impacteurs sur milieu solide	45
2.2. Impacteurs sur milieu liquide	47
3. Collecteurs à filtration	49
4. Collecteurs à précipitation électrostatique	52
5. Combinaison de ces méthodes avec la détection virale	54
V. Le coronavirus bovin et son rôle pathogène respiratoire chez les bovins. 56	56
1. Découverte et histoire du virus	56
2. Taxonomie	57
3. Caractéristiques virales	58
4. Formes cliniques liées à l'infection par le BCoV	60
5. Épidémiologie et transmission du virus	61
5.1. Épidémiologie	61
5.2. Parenté entre les souches des différentes formes cliniques	63
5.3. Transmission interspécifique	64

6. Pathogénie respiratoire	66
6.1. Rôle pathogène	66
6.2. Lésions	70
<i>PARTIE EXPÉRIMENTALE</i>.....	71
<i>I. Présentation générale du projet expérimental</i>.....	71
1. Contexte, enjeux et positionnement du projet par rapport à l'état de l'art	71
2. Objectifs du projet et verrous techniques	74
3. Acteurs du projet.....	75
<i>II. Matériels et méthodes</i>	77
1. Accord du comité d'éthique	77
2. Plan de travail du projet et détail des phases expérimentales	77
2.1. Plan de travail global	77
2.2. Phase expérimentale 1 : preuve de concept	79
2.3. Phase expérimentale 2 : validation de la balise complète.....	79
3. Étapes préliminaires à l'expérimentation.....	80
3.1. Recrutement des animaux.....	80
3.2. Hébergement et alimentation des animaux pendant l'étude	81
3.3. Protocole d'infection expérimentale des animaux avec le BCoV	82
4. Suivi clinique et paraclinique journalier.....	83
5. Collecte des particules en suspension dans l'air	84
5.1. Conditions de prélèvement.....	84
5.2. Biocollecteurs utilisés	85
5.3. Description et fonctionnement général de la balise Arise	86
6. Évaluation qualitative de la collecte de particules dans l'air	88
7. Éluion des échantillons collectés.....	88
8. Détection des particules virales collectées	89
8.1. Extraction et purification des acides nucléiques.....	89
8.2. Protocole de RT-qPCR	90
8.3. Protocole de RT-LAMP	91
8.4. Statistiques pour comparer les deux méthodes	92
9. Isolement viral en culture et évaluation de l'infectiosité	92
9.1. Pré-traitement des échantillons	92
9.2. Mise en culture	92

9.3.	Détection	93
10.	Euthanasie et autopsie	93
III.	<i>Résultats</i>	94
1.	Description analytique des bovins recrutés pour l'étude	94
2.	Infection virale chez les veaux à la suite de l'inoculation expérimentale d'une souche de BCoV.....	94
2.1.	Charge virale	95
2.2.	Manifestations cliniques	96
3.	Résultats de collecte des aérosols dans la niche	96
4.	Résultats de la détection sur l'animal pris isolément.....	98
4.	Résultats de la détection dans l'air ambiant de la pièce d'hébergement	99
5.	Comparaison des résultats de détection par l'amplification LAMP par rapport à la qPCR commerciale.....	100
5.1.	Accord des méthodes de détection et calcul des valeurs de sensibilité et de spécificité de la LAMP	100
5.2.	Seuil de détection du BCoV.....	101
5.3.	Temps de détection	103
6.	Résultats sur l'infectiosité de l'air	105
7.	Résultats de l'autopsie	106
IV.	<i>Discussion et conclusions de l'étude expérimentale</i>.....	107
1.	Infection expérimentale par le BCoV et excrétion virale dans l'air expiré	107
2.	Comparaison des biocollecteurs par rapport aux méthodes de collecte traditionnelles.....	107
2.1.	Simplicité et rapidité d'exécution	107
2.2.	Collecte virale	108
2.3.	Précocité de collecte	108
3.	Comparaison des biocollecteurs entre eux	109
3.1.	Simplicité et rapidité d'exécution	109
3.2.	Collecte virale	110
3.3.	Précocité de collecte	110
3.4.	Positionnement de la balise Arise par rapport à l'état de l'art.....	111
4.	Comparaison des méthodes de détection par amplification	112
4.1.	Simplicité d'exécution	112

4.2.	Fiabilité du résultat	112
4.3.	Durée de détection	113
4.4.	Coût de l'analyse	113
4.5.	Positionnement de la méthode LAMP par rapport à l'état de l'art	113
5.	Limites	114
5.1.	Infection expérimentale	114
5.2.	Nombre d'animaux inclus dans l'étude	114
5.3.	Conditions expérimentales	115
5.4.	Durée de suivi des animaux	115
6.	Perspectives du projet.....	116
7.1.	Finalisation de la balise entièrement autonome	116
7.2.	Déploiement de la balise en élevage.....	116
7.3.	Évaluation de la perception de la balise autonome par une étude qualitative.....	117
7.4.	Élargissement des cibles pathogènes à détecter et des espèces concernées	117
7.5.	Perspectives en médecine humaine.....	117
	CONCLUSION.....	118
	BIBLIOGRAPHIE	120
	ANNEXES.....	156

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Relevés cliniques des bovins.....	156
--	-----

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Réalisation de l'écouvillonnage nasal en pratique. (A) Contention du veau par un assistant avec la tête en extension. (B) Visualisation des cavités nasales en coupe longitudinale lors de l'écouvillonnage chez le veau. (Joulié, Herman, Nicolas 2023) Crédit photo : Zoetis.	18
Figure 2 : Réalisation de l'aspiration trans-trachéale en pratique. (A) Contention d'un bovin adulte au cornadis avec la tête en extension et visualisation du site de ponction tondu. (B) Visualisation de la trachée en coupe longitudinale après mise en place du trocard et lors de la progression du cathéter dans la trachée chez le bovin adulte. (Joulié, Herman, Nicolas 2023) Crédit photo : Zoetis.	23
Figure 3 : Réalisation du lavage broncho-alvéolaire en pratique. (A) Matériel nécessaire à la réalisation du LBA : tubes extérieur et intérieur, soluté isotonique stérile, seringue, aiguille, tube de prélèvement. (B) Contention d'un gros veau attaché avec un licol avec la tête en extension et injection de la solution isotonique. (Joulié, Herman, Nicolas 2023) Crédit photo : Zoetis.....	27
Figure 4 : (A) Impacteur à fente à 5 étages Sioutas (SKC Ltd). (B) Impacteur à 2 étages cycloniques BC251 (NIOSH).	47
Figure 5 : Impacteurs sur milieu liquide. (A) Modèle BioSampler (SKC Ltd). (B) Modèle Coriolis® (Bertin Technologies).....	49
Figure 6 : Collecteurs à filtration sur filtre en gélatine. (A) Modèle IOM. (B) Modèle Button Sampler. Source : SKC Ltd.....	52
Figure 7 : Collecteur Biodosi (Roux et al. 2014).	53
Figure 8 : Taxonomie actuelle des Coronaviridae selon le Comité international de taxonomie des virus (Coronaviridae 2017).	58

Figure 9 : Le coronavirus bovin. (A) Représentation schématique d'un bêtacoronavirus (Coronaviridae 2017). (B) Microscopie électronique immunitaire du BCoV respiratoire adapté à la culture tissulaire (Saif 2010). Les particules ont réagi avec les antisérums contre le BCoV, montrant une surface HE plus courte (tête de flèche blanche) et des pointes S plus longues (flèche noire). La barre équivaut à 100 μm	59
Figure 10 : Signes cliniques et impact économique des formes cliniques du BCoV chez les bovins (Hodnik, Ježek, Starič 2020).....	61
Figure 11 : Prévalence globale du BCoV (Zhu, Li, Sun 2022).	62
Figure 12 : Transmission interspécifique potentielle du BCoV (Zhu, Li, Sun 2022)...	66
Figure 13 : Description schématique de la solution proposée.	75
Figure 14 : Frise chronologique synthétisant les étapes clés du projet AIDAV.	78
Figure 15 : Case d'exercice des veaux. Crédit photo : photos originales.	82
Figure 16 : Conditions de prélèvement. (A) Prélèvement d'ambiance dans l'air de la pièce, face à l'aire de repos, en dehors de l'aire de vie. (B) Prélèvement individuel en niche fermée. Crédit photo : photos originales.	85
Figure 17 : Module Arise. (A) Carte microfluidique de collecte seule avec deux chambre de collecte distinctes. (B) Carte microfluidique complète intégrant la collecte, l'élution et la détection virale. (C) Module portatif permettant d'actionner une carte microfluidique. (D) Processus de fonctionnement. Source : Poster "Towards detection of airborne pathogenic microorganisms by a micrototal analysis system", Blaire et al., 2023, présenté lors de la 27 ^{ème} Conférence Internationale sur les systèmes miniaturisés pour la chimie et les sciences de la vie à Katowice (en Pologne).	87
Figure 18 : Charge virale évaluée sur des écouvillons nasaux profonds analysés en qPCR en fonction du temps écoulé après l'inoculation expérimentale de BCoV. (A) Phase expérimentale 1, juillet 2022 (n=3). (B) Phase expérimentale 2, octobre 2023 (n=3). La ligne en tiret rouge représente la charge virale inoculée dans chaque narine.	95
Figure 19 : Évaluation de la collecte selon deux mesures réalisées le 2 ^{ème} jour de collecte de la phase 2 en octobre 2023. (A) Évolution de la concentration en CO ₂ en fonction du temps. (B) Distribution granulométrique des concentrations en particules en fonction du temps.....	97
Figure 20 : Seuil de détection par qPCR du BCoV à partir des prélèvements nasaux (ENP) et de l'air de la niche à l'aide des trois collecteurs (Arise, Biodosi, Button Sampler) en fonction du temps post-infection. (A) Lors de la phase 1, avec une échelle	

de temps post-infection en jours (n=3). (B) Lors de la phase 2, avec une échelle de temps post-infection en heures (n=3).	98
Figure 21 : Seuil de détection par qPCR du BCoV dans la pièce à partir des prélèvements d'air des trois collecteurs en fonction du temps post-infection. (A) Lors de la phase 1, avec une échelle de temps post-infection en jours (n=1). (B) Lors de la phase 2, avec une échelle de temps post-infection en heures (n=1).	99
Figure 22 : Seuil de détection du BCoV en fonction du temps post-infection (en heures) par les deux méthodes de détection (qPCR et LAMP) pour les veaux de la phase 2 (#96, #101, #112). (A) Sur les échantillons issus des écouvillons nasaux profonds. (B) Sur les échantillons d'air collectés par le module Arise.	102
Figure 23 : Durée nécessaire à la détection du BCoV en fonction du temps post-infection (en heures) par les deux méthodes de détection (qPCR et LAMP) pour les veaux de la phase 2 (#96, #101, #112). (A) Sur les échantillons issus des écouvillons nasaux profonds. (B) Sur les échantillons d'air collectés par le module Arise.	104
Figure 24 : Seuils de détection en qPCR du BCoV sur les échantillons nasaux et individuel d'air expiré des veaux (#49, #50, #51) du 3 ^{ème} jour post-infection après un ou deux passages en culture cellulaire.	105
Figure 25 : Exemples de détection du BCoV par immunofluorescence. Passage 1 : (A) et (B) Écouvillons nasaux ; (C) : Module Arise. Passage 2 : (D) Écouvillon nasal ; (E) Module Arise ; (F) Témoin négatif.	105
Figure 26 : Efficacité de collecte et d'enrichissement des aérosols par la balise Arise. (A) Efficacité de capture en fonction du diamètre des particules d'aérosols et du débit d'air. (B) Facteur d'enrichissement du module Arise et des instruments commerciaux (Dybwad, Skogan, Blatny 2014; Roux et al. 2016; Pan, Lednicky, Wu 2019; Kim, An, Hwang 2020; Horve et al. 2021; Ratnesar-Shumate et al. 2021; Han et al. 2022; Jang, Bhardwaj, Jang 2022) en fonction du débit d'air. Source : Poster "Towards detection of airborne pathogenic microorganisms by a micrototal analysis system", Blaire et al., 2023, présenté lors de la 27 ^{ème} Conférence Internationale sur les systèmes miniaturisés pour la chimie et les sciences de la vie à Katowice (en Pologne).	111

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des bovins. Pour les races, PH = Prim'Holstein et RH = Red'Holstein. Pour le sexe, M = mâle. Les âges correspondent à l'âge au J0 de l'étude. Les poids sont évalués après l'euthanasie et avant l'autopsie.	94
Tableau 2 : Tableau de contingence des résultats d'amplification par les méthodes de qPCR et LAMP sur les prélèvements de la phase 2 (n=83). Les cases vertes signifient que les méthodes indiquent le même résultat, les cases oranges des résultats différents.	100
Tableau 3 : Tableau rassemblant l'accord Kappa de Cohen de la LAMP avec la référence de qPCR et les propriétés de la LAMP lors de la phase 2 de l'étude.	100

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACGIH : American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
AGI : Impacteurs tout en verre
AIDAV : Approches Innovantes pour la Détection des Agents Viraux
ANR : Agence Nationale de la Recherche
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ATH : Aérosol en Hydrosol
ATT : Aspiration Trans-Trachéale
BCoV : Coronavirus Bovin
BHV-1 : Herpèsvirus Bovin de type 1
BIOEPAR : Biologie, Épidémiologie et Analyse de Risque en santé animale
BPI3V : Virus Parainfluenza de type 3
BRSV : Virus Respiratoire Syncytial Bovin
BVDV : Virus de la Diarrhée Virale Bovine
CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives
CO₂ : dioxyde de carbone
Ct : Cycle de seuil
EIP : École d'Ingénieur de Purpan
ELISA : Test Immuno-Enzymatique
EN : Écouvillonnage/Écouvillon Nasal
ENP : Écouvillonnage/Écouvillon Nasopharyngé Profond
ENVT : École Nationale Vétérinaire de Toulouse
EPC : contrôle positif d'amplification
EPEC : *Escherichia coli* entérotoxigènes
ETEC : *Escherichia coli* entérotoxigènes
F2E : France Futur Élevages
FluD : Influenza D
ICAM-1 : Molécule d'Adhésion Inter-Cellulaire-1
ICRP : Comité International de Protection Radiologique
Idele : Institut de l'élevage
IHAP : Interactions Hôtes-Agents Pathogènes
INRAe : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
LAMP : Amplification Isotherme Médiée par des Boucles
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
LFA : Test Immuno-chromatographique à Flux Latéral
LSMB : Laboratoire de Systèmes Microfluidiques et de Biotechnologies
MRB : Maladies Respiratoires Bovines
NC : contrôle négatif d'amplification
NCS : contrôle négatif de processus

NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Oniris : École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation de Nantes-Atlantique

PAF-R : Récepteur du Facteur d'Activation Plaquettaire

pb : Paires de Bases

PBS : Tampon de phosphate salin

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

pH : Potentiel Hydrogène

PTFE : polytétrafluoroéthylène (téflon®)

qPCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative en temps réel

RT : Transcription Inverse

SARS-CoV-2 : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère lié au Coronavirus 2

TCID₅₀ : Dose Infectieuse de Culture Tissulaire à 50%

UV : Rayons Ultra-Violets

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Partout dans le monde, les maladies respiratoires sont des troubles de la santé des bovins avec des conséquences majeures dans tous les systèmes d'élevage avec stabulation. Elles compromettent la rentabilité et la durabilité de ce secteur. Les maladies respiratoires bovines (MRB) ont un impact important sur l'industrie bovine, avec des pertes économiques dues à la morbidité, à la mortalité, aux coûts de traitement et de prévention, à la perte de production et à la réduction de la qualité des carcasses (Duff, Galyean 2007; Fulton 2009). En particulier, les maladies respiratoires affectent les veaux aussi bien en élevage laitier qu'allaitant, dans le monde entier (Griffin 1997; Snowden et al. 2006; Pardon et al. 2013; Lehenbauer 2014). En France, par exemple, les pertes associées à ces maladies sont évaluées de 11 à 26% des revenus de ces ateliers (Bareille et al. 2008). De plus, le traitement des maladies respiratoires est une des principales causes d'utilisation d'antibiotiques, notamment dans les ateliers d'engraissement de jeunes bovins (Fulton 2009). Dans ce contexte, la surveillance et l'identification des pathogènes associés aux MRB permettrait de faciliter le développement de programmes thérapeutiques et vaccinaux ciblés et adaptés (Doyle et al. 2017).

Les maladies respiratoires sont multifactorielles, causées par divers agents pathogènes qui agissent souvent en association (Taylor et al. 2010; Klima et al. 2019). Les virus comme le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV), le coronavirus bovin (BCoV), le virus parainfluenza de type 3 (BPI3V) et le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) peuvent être des pathogènes directs et provoquer l'apparition de signes cliniques, ou prédisposer l'animal à une infection bactérienne (Mosier 2015). En effet, Babiuk et al. (Babiuk, Lawman, Ohmann 1988) et Baudet et al. (Baudet et al. 1994) concluent que les infections virales précèdent une pneumonie bactérienne dans 90% des cas ; en particulier celles qui sont dues au BRSV (Larsen et al. 1999; Uttenthal et al. 2000). Dans certains cas, les bactéries peuvent aussi être la cause primaire de la pneumonie (Tegtmeier et al. 1999; 2000). Les pathogènes bactériens les plus fréquemment impliqués sont des pasteurelles comme *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* et *Histophilus somni*, et des mycoplasmes dont *Mycoplasma bovis* (Bryson 1985; Griffin et al. 2010a).

Généralement, la broncho-pneumonie est détectée en observant des signes cliniques tels que la dépression, l'anorexie, l'écoulement nasal, la toux et la fièvre (Griffin et al. 2010b). Cependant, ces signes cliniques sont insuffisants pour déterminer l'agent pathogène causal de l'apparition de la maladie. Plusieurs méthodes permettent de prélever des échantillons au sein des voies respiratoires des bovins dans le but de mettre en évidence le ou les agent(s) pathogène(s), notamment l'écouvillonnage nasal (EN) ou nasopharyngé profond (ENP), l'aspiration trans-trachéale (ATT) et le lavage broncho-alvéolaire (LBA) en aveugle ou guidé par endoscopie (Doyle et al. 2017). Ces méthodes bien qu'invasives sont les principales méthodes utilisées en pratique pour la réalisation du prélèvement d'échantillons respiratoires (Fulton, Confer 2012).

À notre connaissance aucune méthode de prélèvement de l'air expiré n'est utilisée à l'heure actuelle en routine dans le cadre du diagnostic des maladies respiratoires chez les bovins. L'émergence du coronavirus a toutefois suscité un intérêt pour cette approche. En effet, au cours de l'infection, les virus se répliquent dans les cellules épithéliales des voies respiratoires et sont excrétés dans l'air exhalé et les sécrétions nasales (Valarcher et al. 1999; Saif 2010a; Taylor et al. 2010). La transmission virale peut alors se faire par contact de mufler à mufler, via du matériel d'élevage contaminé par des gouttelettes expectorées et par aérosols. La transmission par aérosol a été démontrée de manière expérimentale en milieu clos (Mars, Brusckhe, van Oirschot 1999). Ainsi, se pose la problématique de la mise au point d'outils innovants pour la détection des agents viraux respiratoires dans l'air afin de permettre le diagnostic étiologique des MRB de façon rapide, simple et non invasive pour réduire à minima le stress créé chez l'animal, et afin qu'il soit réalisable à l'échelle du troupeau pour monitorer son statut sanitaire.

Pour introduire cette problématique, la description des méthodes actuelles de collecte des échantillons à visée diagnostique dans les voies respiratoires des bovins vivants souligne les limites et la lourdeur des techniques actuellement disponibles. De plus, les méthodes de détection utilisées en routine impliquent que les échantillons soient acheminés vers un laboratoire d'analyses pour y être traités ; les résultats ne sont pas disponibles le plus souvent avant plusieurs jours, et ne peuvent pas être pris en compte dans les choix thérapeutiques. De ce constat, découlent la nécessité de comprendre parfaitement les modalités de transmission virale par voie aérienne et le développement de méthodes pour la collecte des agents pathogènes en suspension

dans l'air. L'étude du coronavirus bovin (BCoV) comme modèle infectieux et la compréhension de son rôle pathogène en pathologie respiratoire va permettre de dégager les caractéristiques virales essentielles à appréhender pour le détecter en routine sur des bovins atteints de MRB.

Dans un second temps, l'étude expérimentale portera sur la mise au point et d'un outil innovant portatif destiné à la détection des agents viraux respiratoires dans l'air expiré chez le veau, de façon simple et rapide, et applicable directement dans les élevages ; et son évaluation grâce au modèle d'infection expérimentale de veaux par le BCoV.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE INTRODUCTIVE

I. Collecte d'échantillons respiratoires sur animal vivant : inventaire des méthodes actuelles

Dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux méthodes de collecte qui permettent le prélèvement direct d'échantillons dans l'appareil respiratoire sur un animal vivant dans le but d'un diagnostic étiologique en présence d'une affection respiratoire . La description des méthodes actuelles de collecte est élargie à tous les agents pathogènes respiratoires, à la fois bactériens et viraux.

Les méthodes de prélèvement ante-mortem permettant d'obtenir des échantillons des voies respiratoires des bovins comprennent : l'écouvillonnage nasal ou nasopharyngé profond, l'aspiration trans-trachéale et le lavage broncho-alvéolaire.

1. Conditions préalables au prélèvement

Préalablement, dans le cadre du diagnostic étiologique des MRB, il faut prendre en considération plusieurs modalités propres à ces affections. Les prélèvements doivent être adéquats ; c'est-à-dire idéalement localisés dans le site respiratoire de prédilection des pathogènes en cause, au bon moment au cours de l'infection (Baskerville 1981). En effet, l'appareil respiratoire inférieur est plus susceptible d'héberger les agents pathogènes responsables de la pneumonie et sont moins susceptibles d'être contaminés par des agents commensaux de l'appareil respiratoire supérieur ; cette région anatomique est par ailleurs particulièrement difficile à prélever de façon non invasive.

En plus des considérations liées à l'accès au moment de l'échantillonnage, le moment du prélèvement est d'une importance majeure. Le moment doit être considéré dans le contexte du cycle de multiplication et de colonisation des agents pathogènes chez l'animal hôte. Les concentrations de particules virales présentes dans les

sécrétions varient fortement au cours des différentes phases de l'infection. Par exemple, dans la plupart des infections respiratoires virales, la concentration de particules virales dans les sécrétions nasales est faible pendant les 2 premiers jours, puis elle augmente ensuite rapidement et reste élevé pendant encore 4 à 5 jours, pour diminuer progressivement et disparaître après 10 jours environ. Pour détecter de façon fiable un virus respiratoire, il est important d'intervenir au tout début de l'évolution, à la phase d'hyperthermie ou des symptômes cliniques (jetage séreux, fréquence et amplitude respiratoires augmentées), ces derniers étant quelquefois le signe tardif et postérieur à l'excrétion virale par les voies respiratoires supérieures (Fortier 1997). Il existe néanmoins des variations dans ce modèle d'excrétion selon l'agent pathogène considéré. En pratique, les difficultés de prélèvement surviennent lorsque le vétérinaire est appelé pour examiner un animal une fois que les signes de la maladie respiratoire sont graves, et qu'ils évoluent depuis plusieurs jours. Dans de tels cas, il est tout à fait probable que le stade d'excrétion maximale du virus soit dépassé, souvent les signes cliniques graves ou marqués surviennent plutôt aux stades tardifs ou avancés de l'infection. Pour cette raison, il est conseillé de prélever des échantillons sur plusieurs animaux dans le groupe dans le but de couvrir les différentes phases de l'infection, et ainsi augmenter la probabilité de détection de l'agent primaire.

2. L'écouvillonnage nasal (EN) et l'écouvillonnage nasopharyngé profond (ENP)

L'écouvillonnage de l'appareil respiratoire supérieur permet le prélèvement de mucus nasal et de cellules de la partie proximales et distales des cavités nasales et du pharynx.

2.1. Matériel

Le prélèvement nécessite comme unique matériel un écouvillon stérile. L'écouvillon utilisé doit être assez long, au moins 30 cm (Allen et al. 1991a) jusqu'à 76 cm (Godinho et al. 2007). Il faut proscrire les écouvillons avec un manche en bois et/ou une tête en coton car ils réduisent la probabilité de succès des isollements bactériens et viraux (Baskerville 1981). Les écouvillons constitués d'un bourgeon en fibres de

polyester favorisent le brossage en raclant plus efficacement les cellules de la muqueuse que le coton ; en outre, elles ne provoquent pas d'inhibition des micro-organismes et les cellules hôtes se détachent plus facilement de la surface de l'écouvillon lors de la réalisation du frottis (Oates, Selwyn, Breach 1971; Phillips, Grim 1965). Quant au manche, une tige fine métallique ou une tige de plastique sont préférables.

De nombreuses études utilisent un écouvillon utérin destiné aux prélèvements lors de métrite chez la jument ; ils permettent un prélèvement suffisamment profond de l'appareil respiratoire haut. De plus, ces écouvillons sont protégés dans une gaine qui permet la progression dans les cavités nasales proximales sans contamination par la flore commensale. D'après Doyle et al., ces écouvillons utérins sont plus longs que nécessaire dans le cas d'ENP et rendent la mise en œuvre délicate (Doyle et al. 2017).

2.2. Réalisation

Pour réaliser le prélèvement, une contention minimale est nécessaire. Dans la méthode décrite par Allen et al., les bovins dont le poids est supérieur à 100kg sont debout dans une cage de contention avec la tête relevée à l'aide d'un support ou d'une corde autour des cornes (Allen et al. 1991a). Pour les jeunes veaux, un licol suffit pour la contention ; Godinho et al. font tenir le veau par un assistant avec la tête maintenue en extension (Godinho et al. 2007). Quel que soit le format du bovin, aucune sédation n'est généralement nécessaire.

Préalablement au prélèvement, le mufler peut être nettoyé des éventuels écoulements avec un tampon imbibé de sérum physiologique (Fedida et al. 1985). L'écouvillon doit, ensuite, être introduit dans la cavité nasale et enfoncé d'au moins 15 centimètres pour un EN, et de 20 cm pour un ENP sur un gros bovin (McDanel, Kuehn, Keele 2018). Sur des veaux de moins de 100 kg, les cavités nasales étant plus courtes, l'ENP est réalisé à moindre profondeur. Une fois que la profondeur d'écouvillonnage souhaitée est atteinte, l'écouvillon est frotté vigoureusement contre la muqueuse en effectuant des mouvements de rotation (Allen et al. 1991a). La qualité du prélèvement dépend de cette phase, puisque les recherches virales dépendent de la quantité de cellules recueillies (Maillard, Douart 2003). Certains auteurs recommandent de froter jusqu'à la rosée sanguine pour prélever des cellules car

certaines virus sont intracellulaires, mais cette action n'est pas nécessaire et peut provoquer une épistaxis. Si l'écouvillon utilisé est muni d'une gaine de protection, l'écouvillon est extrait de la gaine une fois le site de prélèvement atteint puis réintégré à l'intérieur une fois le prélèvement réalisé (Godinho et al. 2007).

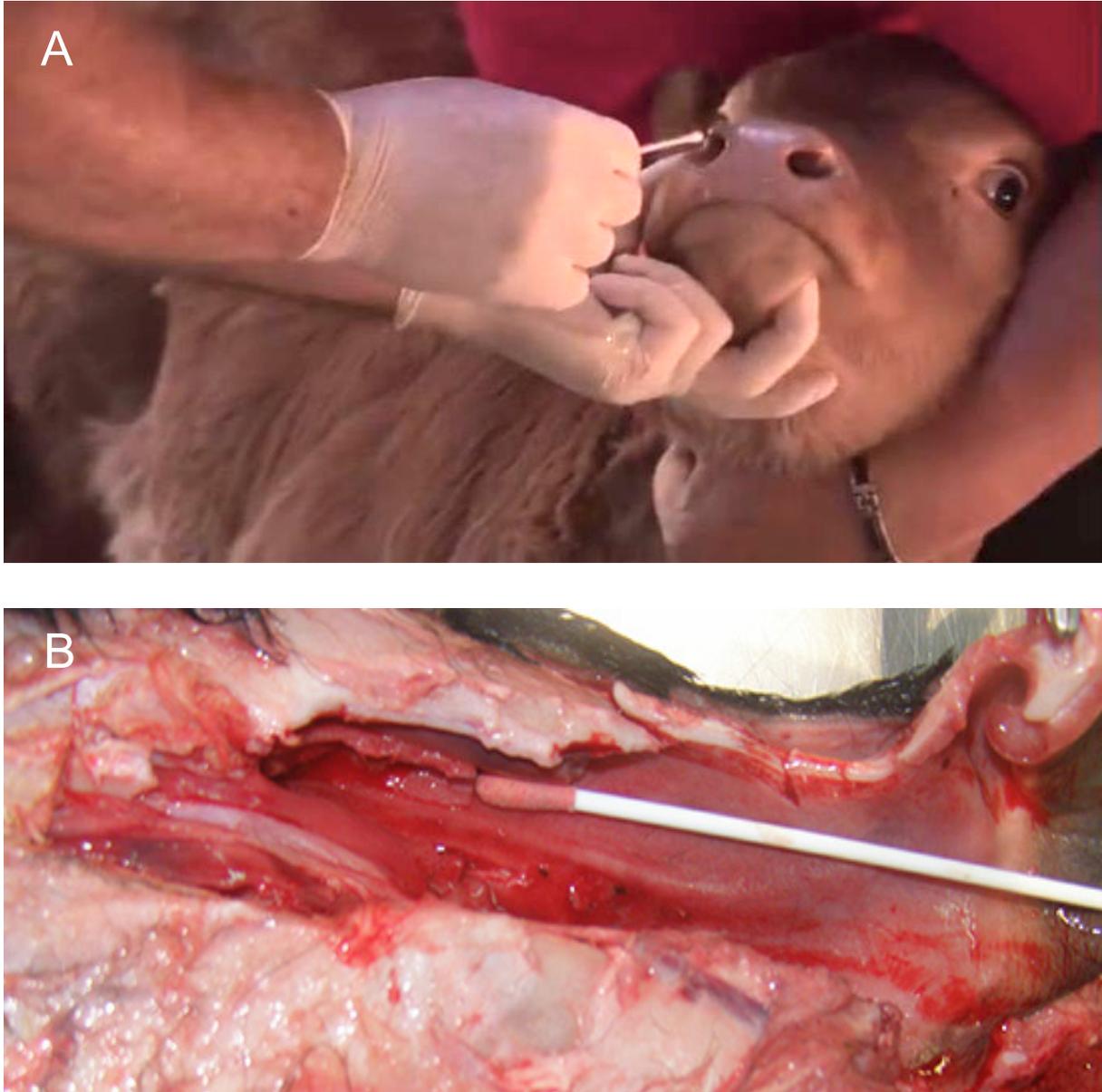


Figure 1 : Réalisation de l'écouvillonnage nasal en pratique. (A) Contention du veau par un assistant avec la tête en extension. (B) Visualisation des cavités nasales en coupe longitudinale lors de l'écouvillonnage chez le veau. (Joulié, Herman, Nicolas 2023) Crédit photo : Zoetis.

2.3. Conditionnement de l'échantillon

Pour l'analyse ultérieure de l'échantillon prélevé, s'il n'est pas utilisé sur place, l'écouvillon doit être placé dans un support de transport qui le protégera contre la dessiccation, les fluctuations de pH et de température. Certains contiennent un milieu nutritif (Baskerville 1981) mais celui-ci n'est pas souhaitable car il peut interférer avec les analyses ultérieures. Il permet aussi la désorption des cellules collectées (Allen et al. 1991a). Le délai d'acheminement doit être inférieur à 24h, si possible sous couvert du froid positif (Maillard, Douart 2003) ou congelé à -20°C pour une recherche de virus si celle-ci est différée au-delà.

Le prélèvement pourra alors être mis en culture pour un isolement viral avec recherche d'effet cytopathogène et/ou immunochimie. Dans la mesure où un milieu de transport a été utilisé, une recherche de bactéries ou de champignons sera également possible. Toutefois ce prélèvement est principalement utilisé pour des examens virologiques, car il existe un risque de contamination du prélèvement par la flore bactérienne commensale, rendant cette méthode de prélèvement peu pertinente pour la recherche bactérienne.

2.4. Avantages et inconvénients

Les EN sont faciles à prélever et nécessitent peu de contention, essentiellement sur les veaux. Néanmoins, les résultats de l'isolement en culture peuvent s'avérer difficiles à interpréter en présence de germes commensaux (Doyle et al. 2017). Les ENP sont une technique d'échantillonnage de la cavité nasale, qui permet de s'affranchir de la contamination par les bactéries commensales (Holman et al. 2015; Taylor et al. 2015; Timsit et al. 2016; Johnston et al. 2017). De plus, les écouvillons sont très sensibles à la dessiccation rapide ; qui peut entraîner des résultats faussement négatifs notamment pour *Mycoplasma bovis* (Thomas et al. 2002).

L'écouvillon protégé par une gaine utilisé pour un ENP est plus coûteux que l'écouvillon nasal simple utilisé pour un EN. De plus, l'ENP nécessite une contention plus ferme lors du prélèvement. Par conséquent, la contention nécessaire peut augmenter le stress sur l'animal, ce qui n'est pas idéal chez un animal en détresse

respiratoire ; le gain n'est pas rentable lorsqu'il s'agit de prélever un grand nombre de veaux (McDaneld, Kuehn, Keele 2018).

Dans les études de culture bactérienne de Doyle et al. (Doyle et al. 2017) et de séquençage génétique de McDaneld et al. (McDaneld, Kuehn, Keele 2018), le site d'échantillonnage, nasal ou nasopharyngé profond, n'a pas influencé la nature et la diversité des populations bactériennes de la cavité nasale supérieure. Ces résultats démontrent que des EN plus courts et moins invasifs produisent des résultats similaires aux ENP. D'autant plus, qu'en réalisant des EN sur de nombreux veaux, la sensibilité de la méthode de collecte augmente (Pohjanvirta et al. 2021).

3. L'aspiration trans-trachéale (ATT)

L'aspiration trans-trachéale (ATT) est une méthode de lavage broncho-alvéolaire avec un abord directement dans l'appareil respiratoire inférieur via la trachée pour prélever du mucus et éventuellement des cellules trachéo-bronchiques. Ainsi, contrairement aux autres méthodes employées par voie nasale, elle permet d'éviter le passage dans l'appareil respiratoire supérieur, les cavités nasales, le pharynx et le larynx pour pénétrer directement dans la trachée.

Si l'ATT a été utilisée avec un intérêt diagnostique dès les années 60 en médecine humaine, il a fallu attendre 1974 pour voir décrite une méthode d'aspiration trans-trachéale en médecine vétérinaire. Il s'agissait d'une étude menée par Creighton et Wilkins sur des chiens afin d'évaluer la validité de l'ATT dans le diagnostic étiologique des maladies respiratoires (Creighton, Wilkins 1974). Par la suite, Mac Laughlin et Miske adaptent cette technique aux bovins et réalisent des ATT sur des veaux Holstein en bonne santé afin d'évaluer les éventuelles complications inhérentes à la technique (McLaughlin, Miske 1980). Puis, Viso et al. ont mis au point et développé en 1983 une technique d'ATT afin d'obtenir, aisément et avec une bonne innocuité, des prélèvements trachéo-bronchiques sur le terrain, qui soient exploitables au laboratoire (Viso, Espinasse, Laval 1983; Viso, Espinasse 1988). Étant eux-mêmes praticiens, Zundel, Lamblin et Gouffe ont tenté de proposer une technique d'ATT réalisable par tout vétérinaire et dans toutes les conditions d'élevage qui se rapproche de la technique telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui (Zundel et al. 1985).

3.1. Matériel

Le matériel utilisé actuellement est relativement identique à celui décrit par Zundel et al. (Zundel et al. 1985; Navetat 1995). Il se compose principalement d'un cathéter veineux stérile de 50 cm (Espinasse et al. 1991) à 75 cm de longueur et de 1,5 mm de diamètre interne. Le modèle le plus couramment utilisé est l'ORX-CENTRACATH (Vygon, Ecoen, France). Pour la réalisation du prélèvement, une seringue stérile de 50 ml, des aiguilles stériles, une poche de liquide physiologique (NaCl à 0,9%) et des tubes à prélèvements stériles de 5 ml type Vacutainer® sont également nécessaires.

3.2. Réalisation

La contention est identique à celle décrite dans le cadre d'un EN ou d'un ENP. La tête doit être attachée bien en hauteur afin que l'encolure se trouve en extension modérée et que la tête reste dans l'axe du corps. Dans cette position, la trachée et ses anneaux sont facilement palpables à mi-hauteur de l'encolure. Comme pour l'EN ou l'ENP, dans la plupart des cas aucune sédation n'est nécessaire. Pour limiter le stress du bovin et améliorer la qualité de prélèvement, Angen et al. utilise une sédation avec de la xylazine à 0,1-0,2 mg/kg par voie intra-musculaire (Angen et al. 2009). Néanmoins, la sédation n'est pas conseillée, car les bovins prélevés sont insuffisants respiratoires à des degrés plus ou moins marqués, ce qui rend délicate l'utilisation d' α 2-agonistes (xylazine notamment).

Le site de ponction est situé dans le plan médian de l'encolure plutôt à la limite entre le tiers moyen et le tiers inférieur, c'est-à-dire 7 à 10 cm distalement au larynx sur des veaux de moins de 100kg selon Angen et al. (Angen et al. 2009). Il est conseillé de ponctionner du côté droit afin d'éviter de léser l'œsophage. Pour préparer le site de ponction, une tonte est réalisée ainsi qu'une désinfection chirurgicale à l'aide de dérivés iodés (Espinasse et al. 1991). Avant de commencer l'opération, il faut estimer la longueur nécessaire du cathéter en l'appliquant le long de l'encolure, sans le sortir de son emballage stérile, et en mesurant la distance entre la zone de ponction et l'entrée de la poitrine. Une anesthésie locale à la lidocaïne peut être envisagée (Angen et al. 2009) ; mais elle est en pratique inutile si la contention est correctement assurée. Avant la mise en place du cathéter, certaines études recommandent de réaliser une

incision cutanée de 1 cm en regard de la trachée (Angen et al. 2009) pour éviter d'endommager la tubulure du cathéter lors de la ponction. À cet endroit, la trachée est trocardée avec le mandrin placé ventralement et perpendiculairement à son axe, entre deux anneaux, le biseau étant dirigé vers le bas. Le cathéter est ensuite poussé délicatement dans la trachée, sans forcer et en dépliant au fur et à mesure la gaine de protection stérile. Le passage du carrefour trachéobronchique est marqué par une toux réflexe assez forte. Le cathéter est alors introduit sur quelques centimètres supplémentaires. Selon l'âge et la taille des animaux, il se trouve alors enfoncé pour une longueur totale de 40 à 70 cm.

Une fois en place, le lavage trachéobronchique peut être réalisé. Cinquante mL de soluté de chlorure de sodium, préparé dans la seringue stérile, sont alors injectés dans le cathéter. Immédiatement après, l'opérateur aspire une partie du liquide injecté. La quantité de liquide ainsi récupéré varie de 1 à 10 mL, avec une moyenne de 2 à 3 mL. L'aspect trouble et muqueux du liquide signifie que celui-ci ne représente pas uniquement le volume résiduel de soluté contenu dans le cathéter et que le prélèvement est réussi. Dans le cas contraire, on peut, sans risque pour l'animal, réinjecter 50 ml de chlorure de sodium stérile et aspirer de nouveau. Si le prélèvement semble trop contaminé par du sang, il est préférable de recommencer l'opération en ponctionnant plus ventralement.

Le cathéter et le trocart sont retirés ensemble de façon à ne pas couper le cathéter avec le trocart dans la trachée. Le point de ponction est à nouveau désinfecté. La cicatrisation se fera par seconde intention, sans qu'il soit nécessaire de faire des points cutanés.

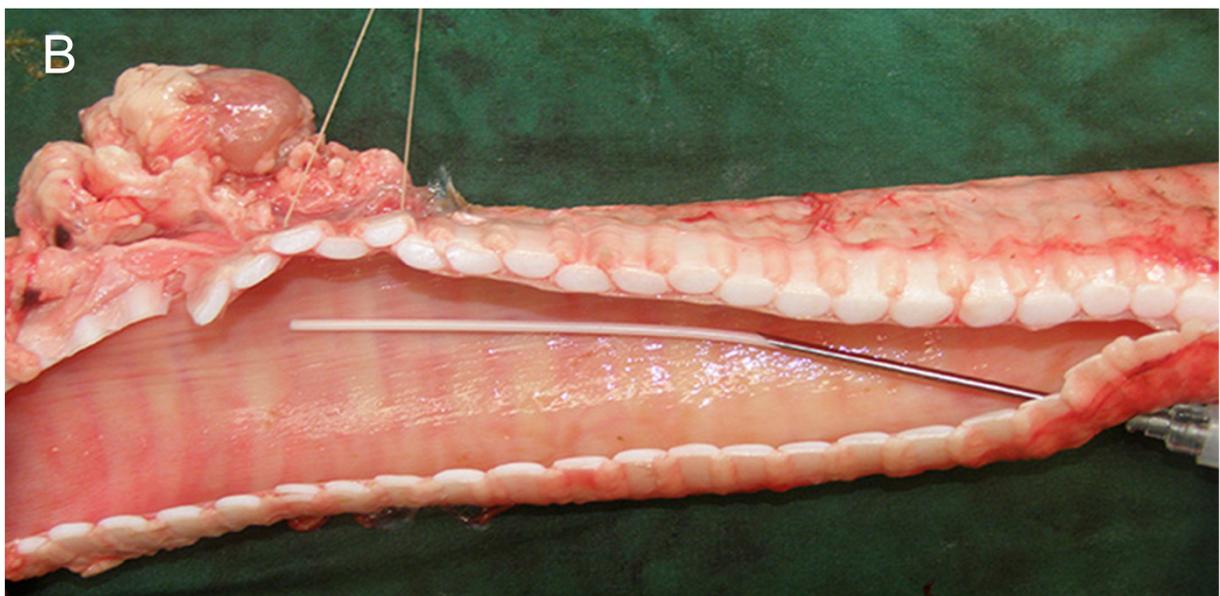


Figure 2 : Réalisation de l'aspiration trans-trachéale en pratique. (A) Contention d'un bovin adulte au cornadis avec la tête en extension et visualisation du site de ponction tondu. (B) Visualisation de la trachée en coupe longitudinale après mise en place du trocard et lors de la progression du cathéter dans la trachée chez le bovin adulte. (Joulié, Herman, Nicolas 2023) Crédit photo : Zoetis.

3.3. Conditionnement de l'échantillon

Le prélèvement est alors introduit dans le tube stérile prévu à cet effet. Il est conservé à 4°C au réfrigérateur et doit être idéalement analysé dans les 24h.

3.4. Avantages et inconvénients

Cette technique ne nécessite généralement pas de sédation. Même si l'ATT permet un prélèvement de l'appareil respiratoire profond en s'affranchissant des contaminations par les germes commensaux du nasopharynx, la procédure est invasive et chronophage. Peu de complications sont à redouter. Des hématomes et un léger emphysème peuvent apparaître sur la zone de ponction ; ils sont sans gravité.

Cette méthode est plus invasive que le LBA que nous allons décrire maintenant, et nécessite une préparation chirurgicale du site de ponction trachéal et une asepsie correctement réalisée.

4. Lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) a pour objectif de prélever des sécrétions et des cellules bronchiques et alvéolaires. C'est la seule technique qui permet de récupérer du liquide alvéolaire et un échantillon assez riche en cellules. En effet, le matériel collecté est constitué de cellules prélevées dans l'appareil respiratoire profond et exempt des cellules dégénérées et du mucus qui caractérisent les échantillons prélevés dans le nasopharynx (Caldow 2001).

À la fin des années 70, (Wilkie, Markham 1979) ont introduit le lavage bronchoalvéolaire chez les bovins vivants comme un outil de recherche sûr et reproductible qui a ensuite été utilisé dans de nombreuses autres études pour l'étude de la réponse immunitaire cellulaire et humorale dans les voies respiratoires inférieures des bovins.

Le LBA peut être réalisé selon deux abords : par sondage nasal (Fogarty 1990; Caldow 2001) ou sous endo-bronchoscopie (Pringle et al. 1988; Allen et al. 1991b). Il faut savoir que l'abord par sondage nasal est peu utilisé chez les veaux en raison d'un méat ventral des cavités nasales trop étroit à cet âge-là.

4.1. Matériel

- *Prélèvement par sondage nasal :*

Il nécessite un cathéter de LBA composé de deux tubes. Un tube extérieur, mesurant 1 m de long, avec un calibre de 8 mm et une épaisseur de paroi de 1 à 75 mm permet d'introduire et de guider un tube intérieur, de 2 m de long, avec un calibre de 4,5 mm et une épaisseur de paroi de 0 à 9 mm. Le tube extérieur peut être stérilisé mais le tube intérieur est à usage unique.

- *Prélèvement par endoscopie :*

Il est réalisé à l'aide d'un fibroscope souple. Chez les bovins adultes, on utilise un endoscope de grande taille, d'une longueur de 2 m et de 12 mm de diamètre. Chez le veau, en revanche, le diamètre de l'endoscope ne sera que de 8 à 9 mm (Falcu et al. 2003).

Dans tous les cas, le liquide de lavage le plus couramment utilisé est le soluté salé isotonique (Schelcher et al. 1992). Pour la réalisation du prélèvement, une seringue stérile de 50 ml, des aiguilles stériles, et des tubes à prélèvements stériles de 5 ml type Vacutainer® ou Falcon® sont également nécessaires.

4.2. Réalisation

Dans tous les cas, il faut une excellente contention afin de maintenir la tête bien droite et de ne pas introduire le tube dans l'œsophage.

Quelle que soit la méthode, la voie d'abord est généralement le méat ventral des cavités nasales du bovin. Une anesthésie locale par aspersion de lidocaïne dans les cavités nasales est suffisante pour le sondage simple. Mais chez un animal de moins de 200 kg, le fibroscope peut être introduit par voie buccale. Il sera protégé par la mise en place d'un pas d'âne et d'un tube de plastique rigide.

Idéalement, le matériel doit être recouvert d'une gaine de plastique souple, interdisant les contaminations nasopharyngées. Celle-ci est retirée après l'entrée dans la trachée comme recommandé par (Hoffman et al. 1990).

Pour la méthode guidée par endoscopie, une tranquillisation est systématique avec de la xylazine à 0,25 mg/kg en IM, voire une anesthésie à l'aide de kétamine (5 mg/kg en intra-veineuse). On limite ainsi les risques de réaction brutale de l'animal pouvant abîmer le matériel et blesser les voies respiratoires. L'animal est alors ensuite placé en position sternale (Pringle et al. 1988).

- *Prélèvement par sondage nasal :*

La méthode de Caldow (Caldow 2001) redécrit la méthode de Fogarty (Fogarty 1990). Le muflle et la partie externe des cavités nasales sont nettoyés avec une lingette. Une anesthésie locale peut être réalisée pour empêcher le larynx de se refermer. Le tube externe est introduit le long du méat ventral du côté médial jusqu'à sentir la résistance du larynx. Avec une légère pression, le tube est poussé dans la trachée lorsque l'animal inspire. Ce passage doit provoquer une toux réflexe. À cette étape, il faut s'assurer de ne pas être dans l'œsophage et si tel est le cas, retirer légèrement le tube et retenter de passer au-delà du larynx. Une petite quantité de lubrifiant obstétrical stérile est répartie sur la pointe du tube intérieur qui est ensuite introduit à travers le tube extérieur jusqu'à ce qu'il parvienne à la bifurcation bronchique. Une seringue de 50 mL remplie de solution isotonique stérile tiédie à la température de 37°C est attachée au tube intérieur et la solution est injectée dans les poumons. Après 20 secondes, le fluide de lavage est aspiré, à raison d'environ 10 à 30 mL, avant d'être conditionné.

- *Prélèvement par endoscopie :*

Allen et al. (Allen et al. 1991a) suit la technique décrite par Pringle et al. (Pringle et al. 1988). De la même façon que précédemment, l'endoscope est introduit via le méat ventral de la cavité nasale jusqu'à atteindre la bifurcation des bronches ; le guidage est aisé grâce à la visualisation des structures. Une fois l'endoscope inséré dans une bronche, du liquide de lavage stérile est introduit par le canal de l'endoscope (Maillard, Douart 2003). Ce dernier peut être tiédi avant le prélèvement afin de limiter la toux (Falcy et al. 2003). Après quelques secondes, le liquide est aspiré doucement, à l'aide de la même seringue. Schelcher et al proposent d'injecter de 30 à 60 ml de sérum physiologique pour des recherches microbiologiques (Schelcher et al. 1992).

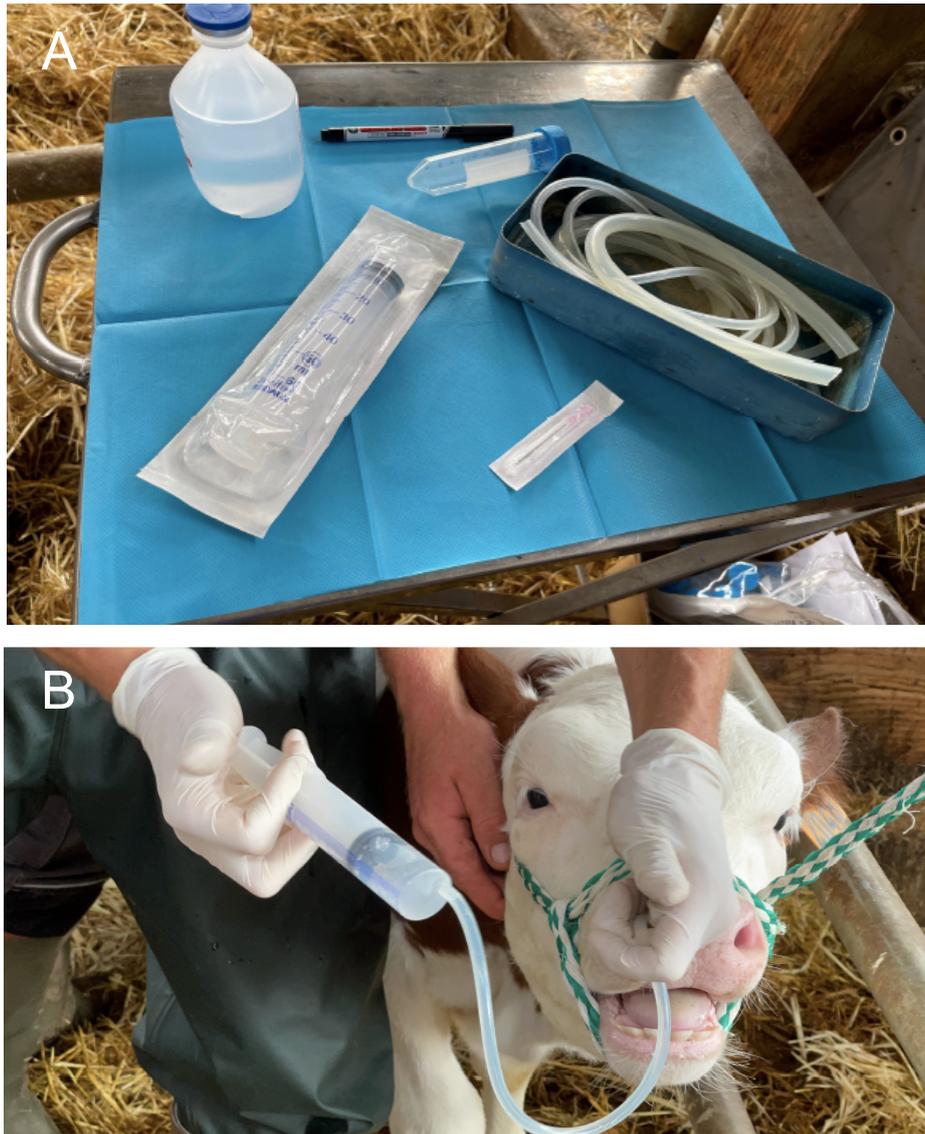


Figure 3 : Réalisation du lavage broncho-alvéolaire en pratique. (A) Matériel nécessaire à la réalisation du LBA : tubes extérieur et intérieur, soluté isotonique stérile, seringue, aiguille, tube de prélèvement. (B) Contention d'un gros veau attaché avec un licol avec la tête en extension et injection de la solution isotonique. (Joulié, Herman, Nicolas 2023) Crédit photo : Zoetis.

4.3. Conditionnement de l'échantillon

Les échantillons obtenus sont conditionnés et acheminés selon les mêmes règles que ceux obtenus par aspiration trans-trachéale. D'après Van Driessche et al., les taux d'isolement optimaux de *M. haemolytica* et *P. multocida* à partir d'échantillons cliniques collectés avec un LBA non endoscopique sont obtenus après stockage entre 0°C et 8°C, à condition que l'échantillon soit cultivé dans les 24h suivant l'échantillonnage (Van Driessche et al. 2020).

4.4. Avantages et inconvénients

Le LBA permet la collecte d'un échantillon représentatif de l'appareil respiratoire profond. Il fournit un prélèvement assez riche en cellules donc elle doit être privilégiée quand on suspecte une pneumonie (Caldow 2001). Il est d'ailleurs, plus intéressant pour l'isolement bactérien que les prélèvements de l'appareil respiratoire supérieur où les pathogènes respiratoires détectés peuvent être commensaux (Caldow 2001).

De plus, comme le LBA échantillonne uniquement l'unité bronchoalvéolaire distale dans laquelle le tube est introduit, il est possible de manquer la détection des agents pathogènes qui ne sont pas uniformément répartis dans le poumon (Doyle et al. 2017).

Le LBA est sans aucun doute une méthode précise pour déterminer la présence d'espèces bactériennes et de mycoplasmes dans le poumon, et peut fournir des informations utiles pour le diagnostic des infections virales, mais un certain nombre de considérations pratiques tendent à limiter son utilisation en clinique (Godinho et al. 2007).

- *Prélèvement par sondage nasal :*

Pour réaliser le LBA sans endoscope, une formation préalable est indispensable. Les avantages sont d'abord d'ordre économique : les cathéters pour le LBA sont bon marché (Van Driessche et al. 2017) et peuvent être stérilisés et réutilisés, ce qui rend possible son utilisation à l'échelle collective. Cependant, l'échantillonnage des bronches se fait à l'aveugle, souvent dans les lobes caudaux de façon probabiliste, donc pas nécessairement dans la région ventro-crâniale, où se localise la grande majorité des pneumonies bactériennes chez le veau (Allan et al. 1985; Allen et al. 1991b; Dagleish et al. 2010). En pratique, cela ne semble pas poser problème puisque même en l'absence de lésions macroscopiques dans les lobes caudaux, il n'y a aucune différence lors du prélèvement que ce soit pour les cellules ou les micro-organismes, entre les lobes pulmonaires crâniens et caudaux, mais seulement des changements significatifs du point de vue statistique dans le nombre de cellules (Pringle et al. 1988).

- *Prélèvement par endoscopie :*

L'utilisation d'un endoscope permet un positionnement précis de la canule de collecte dans les bronches des lobes apicaux du poumon, qui sont souvent ceux où se localise la pneumonie (Caldow 2001). Cependant, le coût de l'équipement exclut cette approche pour un diagnostic de routine, d'autant plus en tenant compte du risque d'endommagement d'un matériel coûteux lors de l'utilisation en fermes. Par ailleurs, une stérilisation du matériel est requise entre chaque animal, ce qui rend son utilisation à l'échelle collective laborieuse.

En effet, il n'est pratiquement pas réalisé dans les élevages car il nécessite une anesthésie générale et majore le risque de détresse respiratoire sur des animaux dont la fonction respiratoire est déjà détériorée.

5. Comparaison entre les méthodes

Des études antérieures (Allen et al. 1991b; DeRosa et al. 2000; Godinho et al. 2007) ont comparé les résultats de cultures bactériennes obtenues à partir de prélèvements par ENP, ATT et LBA sur des bovins avec des signes respiratoires. Elles se sont accordées à montrer que les résultats de l'ENP concordaient souvent, mais pas toujours, avec les résultats d'un prélèvement de l'appareil respiratoire profond de façon correcte à l'échelle individuelle et de façon forte à l'échelle du groupe.

Plus récemment, (Capik et al. 2017) conclut de la même façon que l'ENP concorde de façon fiable avec le LBA, après culture des pasteurelles d'intérêt respiratoire. (Van Driessche et al. 2017) précise que les échantillons de LBA non endoscopiques sont beaucoup moins envahis par les bactéries commensales du nasopharynx que les échantillons d'ENP dans les conditions de son étude, ce qui facilite l'interprétation clinique et entraîne un retour sur investissement plus élevé dans la culture bactériologique.

L'étude de (Doyle et al. 2017) sur des veaux laitiers apporte des connaissances sur la valeur comparative des 4 techniques de prélèvement décrites plus haut, en prenant l'ATT comme référence :

- L'EN, l'ENP et le LBA ont montré une très bonne concordance par rapport à l'ATT pour *M. haemolytica*, *P. multocida* et *M. bovis*. Ainsi, les 4 méthodes sont similaires pour prédire la présence des pasteurelles d'intérêt et les mycoplasmes dans les poumons.
- Lorsque le BRSV a été détecté, l'accord avec l'ATT était modéré pour l'EN, bon pour l'ENP et très bon pour le LBA. Lorsque le BCoV a été détecté, la concordance avec l'ATT était modérée pour l'EN et l'ENP, et bonne pour le LBA, bien que l'EN et l'ENP aient tous deux donné des proportions significativement plus élevées de résultats positifs que l'ATT. Pour les virus, le LBA voire l'ENP pour le BRSV semblent plus fiables.

Actuellement aucun travail n'a étudié si l'accord relatif entre ces tests de diagnostic est le même pour d'autres classes de bovins atteints de MRB, tels que les bovins de parc d'engraissement ou les bovins d'élevage.

II. Méthodes de détection virale en routine

Une fois les échantillons collectés, il faut détecter la présence d'un ou plusieurs agent(s) pathogène(s) cible(s), et éventuellement quantifier la charge microbienne. Les méthodes utilisées actuellement pour identifier les agents pathogènes respiratoires viraux, à partir des prélèvements détaillés précédemment, comprennent : la culture virale, les tests immuno-enzymatiques (ELISA) et la détection par amplification moléculaire avec la PCR ou la LAMP (Fulton, Confer 2012; Pansri et al. 2020).

1. Isolement viral

L'isolement viral permet d'évaluer la capacité des virus à croître en culture cellulaire. C'est la méthode qui était utilisée traditionnellement avant le développement de méthodes de diagnostic moléculaires plus récentes (Fulton, Confer 2012).

Bien que la plupart des isolats de BCoV se multiplient mal en culture cellulaire et ne produisent pas d'effets cytopathiques qu'après un passage en aveugle, plusieurs types cellulaires ont permis l'isolement primaire du virus. Actuellement, l'isolement viral du BCoV a été établi sur une culture de cellules hRT-18g, une lignée cellulaire établie dérivée d'un adénocarcinome rectal humain (Saif et al. 1988).

Lors de l'incubation en culture cellulaire, la réplication virale peut être mise en évidence directement via des effets cytopathologiques ou bien indirectement par révélation avec des anticorps fluorescents, un test ELISA ou de l'immunohistochimie.

En revanche, les méthodes de culture traditionnelles nécessitent généralement plus de 24 heures, des techniques microscopiques et un personnel hautement qualifié, éliminant ainsi les principaux avantages d'un système entièrement automatisé et rapide (Fronczek, Yoon 2015).

2. Test immuno-enzymatique (ELISA)

Les tests immuno-enzymatiques (ELISA) mesurent la capture de l'antigène viral par un anticorps. Les résultats de l'ELISA sont souvent rapportés sous forme de densité optique de la réaction résultante de la fixation d'un deuxième anticorps marqué avec une enzyme réagissant avec son substrat (Fulton, Confer 2012).

Un test ELISA a été développé pour la détection des antigènes de l'herpèsvirus bovin de type 1 (BHV-1) dans des échantillons d'écouvillons nasaux prélevés sur des animaux infectés (Collins et al. 1985). Dans cette étude, le seuil de détection permis par le test ELISA était inférieur en moyenne de $10^{3.5}$ doses infectieuses par rapport au seuil de détection de la culture cellulaire. Un test ELISA de capture antigénique basé sur l'utilisation d'un seul anticorps monoclonal (Mab13) (Hussain, Storz, Kousoulas 1991) qui reconnaît un épitope de la glycoprotéine S du BCoV avec la réactivité la plus large a été testé sur des EN de bovins présentant des signes respiratoires après l'allotement en engraissement (da Silva et al. 1999). La sensibilité du test ELISA a été comparée à l'isolement viral par inoculation en culture cellulaire (hRT-18g). Il est alors sensible et spécifique, mais moins sensible que l'isolement viral ; en revanche, il est beaucoup plus rapide donc utile pour le traitement d'un grand nombre d'échantillons de terrain.

Plus récemment, aux États-Unis, Lathrop et al. ont utilisé un test ELISA développé par Smith et al pour détecter le BCoV dans des échantillons de surnageants obtenus après écouvillonnage comme décrit par Hasoksuz et al. (Smith et al. 1996; Hasoksuz et al. 1999; Lathrop, Wittum, Loerch, et al. 2000; Lathrop, Wittum, Brock, et al. 2000; Cho et al. 2001). Dans l'étude d'Angen et al., le liquide d'ATT est analysé par des tests ELISA décrits par Uttenthal et al. (Uttenthal et al. 2000; Angen et al. 2009).

3. Méthodes d'amplification moléculaire

Les méthodes d'amplification de l'acide nucléique, telles que la RT-qPCR ou la RT-LAMP, sont souvent la technique choisie pour la détection des virus en raison de leur sensibilité et de leur spécificité élevées (Fronczek, Yoon 2015). Malgré les nombreux avantages de ces méthodes de détection, leur mise en œuvre nécessite

plusieurs heures, un équipement coûteux et une qualification approfondie pour leur mise en œuvre. De plus, il est très important de noter que la détection de l'acide nucléique dans l'aérosol n'est pas en corrélation avec la viabilité du virus dans l'aérosol. La capacité de détecter à la fois les virus non viables et viables et de déterminer la fraction de ceux-ci qui est infectieuse est importante pour l'évaluation des risques, car les virus non viables ne provoquent pas d'infections (Pan, Lednicky, Wu 2019).

3.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Traditionnellement, la PCR consistait à amplifier une séquence génétique connue dans un thermocycleur en utilisant une polymérase. Les produits de cette amplification étaient ensuite comparés à des séquences contrôles positives par électrophorèse sur gel d'agarose après marquage avec le bromure d'éthidium (agent intercalant révélé sous rayons UV). Elles peuvent être séquencées et comparées à des séquences publiées des agents spécifiquement recherchés. Pour les virus à ARN, une phase préalable de transcription inverse est requise ; on parle de RT-PCR. Dans tous les cas, cette méthode est qualitative et indique uniquement la présence ou l'absence du produit d'amplification et donc du virus qui le porte. La RT-PCR du BCoV a été décrite par Tsunemitsu et al. (Tsunemitsu, Smith, Saif 1999). Les amorces ont été conçues à partir de la séquence publiée du gène de la nucléocapside de la souche Mebus (Lapps, Hogue, Brian 1987). Pour développer une méthode plus rapide de détection de l'ARN du BCoV, une RT-PCR en une seule étape a été développée comme décrit par Xu et al. (Xu, Harbour, McCrae 1990). La RT et la PCR sont réalisées successivement dans le même tube. Pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR, une deuxième étape de PCR ciblant une partie plus restreinte est ajoutée après la première étape, on parle de PCR nichée. Cho et al. ont comparé une RT-PCR en une étape, ciblant un fragment de 730 pb du gène de la nucléocapside du BCoV, et une PCR nichée, ciblant un fragment de 407 pb du même gène pour détecter le BCoV après écouvillonnage nasal de veaux exposés expérimentalement au BCoV (Cho et al. 2001). La limite de détection la plus basse de la RT-PCR en une étape et de la PCR nichée, déterminée en utilisant des dilutions en série au 1/10 des souches BCoV dans des suspensions préparées à partir d'écouvillons nasaux négatifs pour le BCoV provenant de veaux gnotobiotiques avant infection, était de $2 \cdot 10^4$ et $2 \cdot 10^2$

TCID₅₀/0,1 ml pour chaque souche, respectivement. La limite de détection la plus basse de l'ELISA de capture antigénique telle que déterminée en utilisant les mêmes échantillons dilués en série était de 1.10⁶ TCID₅₀/0,1 ml pour chaque souche. Par conséquent, la RT-PCR en 1 étape et la PCR nichée étaient respectivement 50 et 5000 fois plus sensibles que l'ELISA de capture pour détecter le BCoV dans les suspensions d'EN.

Ces techniques ont été supplantées par la PCR en temps réel. Le principe de la PCR quantitative en temps réel (qPCR) repose sur l'utilisation d'une sonde interne qui produit de la fluorescence proportionnellement à la quantité de fragments amplifiés. Classiquement, les protocoles qPCR sont définis sur 40 cycles d'amplification. Le nombre de cycles à partir duquel cette fluorescence est détectable (appelé Ct pour « Cycle threshold » qui signifie le cycle de seuil) est inversement proportionnel à la quantité de matériel génétique présente au départ dans l'échantillon analysé. Boxus et al. ont développé une RT-qPCR ciblant le gène de la nucléoprotéine pour détecter et quantifier le BRSV dans les voies respiratoires d'animaux infectés (Boxus, Letellier, Kerkhofs 2005). La limite de détection du test s'est avérée être d'environ 10³ copies d'ARN, avec une excellente reproductibilité. Cette méthode s'est avérée 100 fois plus sensible que la RT-PCR conventionnelle sur des échantillons de LBA de veaux infectés expérimentalement. Decaro et al. ont développé et testé une RT-qPCR détectant l'ARN du BCoV sur des échantillons cliniques de bovins (Decaro et al. 2008). La limite de détection du test était de 20 copies d'ARN BCoV (1 log de plus par rapport à la RT-PCR traditionnelle) et la reproductibilité était satisfaisante.

Un format de PCR multiplex permet de détecter simultanément plusieurs virus et/ou bactéries avec un seul test. Cette approche est intéressante dans le cas des MRB puisque l'étiologie est souvent multiple. Le principe repose sur des amorces produisant des fragments amplifiés de différentes tailles et permet ainsi la détection d'acide nucléique de différents agents infectieux en fonction de la taille des produits d'amplification. Maintenant, le multiplexage utilise des sondes d'hybridation qui émette dans des canaux de fluorescence différents. Pansri et al. ont évalué une RT-qPCR multiplex de virus respiratoires au Danemark sur des suspensions à partir d'ATT (Pansri et al. 2020) prélevés comme décrits par (Doyle et al. 2017). Le kit Pneumo4V de RT-qPCR multiplex sur virus est en deux étapes : RT puis qPCR. Ce kit a pu détecter respectivement entre 10 et 50 copies d'ARN cible par réaction, ce qui est

comparable aux méthodes précédemment établies. Pour évaluer les performances de ce test, des RT-qPCR singleplex sont réalisées comme référence en parallèle. Le test est aussi, voire discrètement plus sensible, que les PCR simples avec un accord de l'ordre de 0.71-0.9.

Traditionnellement, la PCR est chronophage et laborieuse : l'ensemble de ce processus peut prendre jusqu'à 4h (Fronczek, Yoon 2015). De plus, dans le cas des génomes à ARN tels que la plupart des virus, une phase de transcription inverse supplémentaire est nécessaire, ce qui ajoute du temps et de la manipulation des échantillons.

3.2. Amplification isotherme médiée par des boucles (LAMP)

Notomi et al. ont développé la LAMP qui correspond à une amplification d'ADN similaire à la PCR mais dans des conditions isothermes (Notomi et al. 2000) ; elle produit des amplicons sous forme de boucles d'ADN, grâce à 6 amorces particulières (FIP amorce sens interne, F3 amorce sens externe, BIP amorce antisens interne, B3 amorce antisens externe, LF amorce boucle interne et LB amorce boucle externe). Elle permet d'amplifier quelques copies d'ADN en 10^9 en moins d'une heure et avec une meilleure spécificité que la PCR ; l'inconvénient est l'absence de quantification. Elle peut être couplée à une RT pour les virus à ARN (Whiting, Champoux 1998). Cette technique est uniquement utilisable pour le diagnostic car la structure initiale du matériel génétique est perdue via les boucles.

La LAMP peut être couplée à des réactifs colorés, dont le changement de couleur est visible à l'œil nu voire quantifiable à l'aide d'une caméra. Plusieurs études ont démontré l'efficacité de la LAMP couplée à un test colorimétrique pour détecter les pasteurelles d'intérêt respiratoire. Mohan et al. ont mis en évidence, à partir d'échantillons nasaux de bovins et à l'aide d'un rapporteur de fluorescence, une spécificité analytique de 89 % et une sensibilité analytique de 99 % (Mohan et al. 2021). Le test développé par Pascual-Garrigos et al. avec des colorants sensibles au pH offre une sensibilité analytique de 66,7 à 100 % et une spécificité analytique de 100% à partir d'écouvillons nasaux reconditionnés ; tout en fournissant une concordance de 60 à 100 % avec les résultats de la PCR, lorsqu'il a été testé sur cinq bovins dans un parc d'engraissement (Pascual-Garrigos et al. 2021).

III. Modalités de transmission virale par voie aérienne

1. Définition d'un bioaérosol respiratoire

1.1. Définition

L'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) définit en 1999 les bioaérosols comme étant des particules aéroportées constituées d'organismes vivants tels que les microorganismes (bactéries, moisissures, virus, protozoaires) ; ou provenant d'organismes vivants (toxines, microorganismes morts ou fragments de microorganismes). Pour illustrer cette définition, chez l'Homme, les expériences de diffusion de la lumière laser récemment publiées par Anfinrud et ses collègues (Anfinrud et al. 2020; Stadnytskyi et al. 2020) montrent que le nombre de gouttelettes de liquide oral émises dans l'air en parlant est de l'ordre de milliers de gouttelettes par seconde.

1.2. Taille

Johnson et al. ont mis en évidence que les aérosols produits sont de taille variable qui dépend du mode d'émission et du site de production au sein des voies respiratoires (Johnson et al. 2011). Le mode bronchiolaire contient des gouttelettes produites par la respiration normale lors de l'expiration et provenant des voies respiratoires inférieures. Alors que le mode laryngé est actif pendant les vocalises et la toux ; il donne des distributions de gouttelettes de 0 à 38 μm centrées sur 4 et 6 μm . Le mode oral produit des gouttelettes provenant des voies respiratoires supérieures y compris la cavité buccale ; il donne une distribution de gouttelettes plus grosses de 38 à 1000 μm centrées sur 220 μm . La majorité des gouttelettes produites sont des petites gouttelettes mais elles ne représentent qu'une faible fraction du volume total émis (Lieber et al. 2021). De plus, Anand et Mayya ont montré par le biais d'une analyse probabiliste que les virus sont plus susceptibles d'être contenus dans les gouttelettes dont la taille est comprise entre 2 et 20 μm (Anand, Mayya 2020). Ainsi, la charge virale peut différer selon la localisation préférentielle du virus dans les voies respiratoires, et selon le mode d'émission des gouttelettes.

Les particules dites inhalables peuvent pénétrer les voies aériennes supérieures. Elles ont un diamètre aérodynamique inférieur à 50 μm . Les particules dites respirables peuvent pénétrer le niveau alvéolaire des poumons ; elles ont un diamètre aérodynamique inférieur à 4 μm .

1.3. Composition

Un aérosol est un ensemble de gouttelettes contenant un fluide respiratoire complexe, constitué, à l'échelle moléculaire, principalement d'eau mais aussi de solutés non volatils dont des sels (Almståhl, Wikström 2003; Schneyer, Young, Schneyer 1972), des lipides (des phospholipides majoritairement dont un surfactant, la dipalmitoylphosphatidylcholine) (Larsson, Olivecrona, Ericson 1996; Vejerano, Marr 2018) et des protéines comme les mucines (Acquier et al. 2015; Abkarian et al. 2020; Abkarian, Stone 2020; Rodríguez-Hakim, Ráz, Vermant 2022), en suspension dans l'air.

Des micro-organismes sont alors véhiculés dans ce milieu ; ils ont des gammes de tailles compatibles avec celles des gouttelettes : les virus mesurent de 0,02 à 0,25 μm , les bactéries de 0,3 à 15 μm et la majorité des moisissures et levures de 1 à 50 μm . Ce sont donc toujours des particules assez petites pour être aérotransportables et surtout assez petites pour pénétrer dans les organismes par voie respiratoire ou digestive et/ou contaminer les revêtements cutanés ou muqueux des organismes vivants.

2. Transmission virale par voie aérienne

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit la transmission par voie aérienne comme « la propagation d'un agent infectieux causée par la dissémination de noyaux de gouttelettes (aérosols évaporés à partir de gouttelettes plus grosses) qui restent infectieux lorsqu'ils sont en suspension dans l'air sur de longues distances et pendant un certain temps ». Actuellement, les études de la physique respiratoire supposent que les gouttelettes respiratoires génèrent des aérosols microscopiques de moins de 5 μm de diamètre.

La transmission aérienne des virus se produit grâce à l'expulsion d'un aérosol par un individu infecté (Merhi et al. 2022). Cet aérosol se retrouve dans l'air sous forme de gouttelettes dans lesquelles des virus respiratoires sont éventuellement véhiculés.

L'évaluation de l'efficacité de la transmission aérienne nécessite une analyse complète des processus physico-chimiques subis par les gouttelettes dans l'air. Les processus impliqués sont le séchage et la sédimentation des gouttelettes, qui contrôlent le temps de suspension des aérosols. Une évaluation de la survie biologique du virus est indispensable au maintien de la virulence lors de la transmission ; notamment face à la faible concentration en eau, la diversité de tailles initiale et de compositions des gouttelettes, et des conditions environnementales dans l'air, telles que l'humidité relative et la température.

2.1. Phase de séchage

Les fluides respiratoires contenus dans les gouttelettes d'aérosols peuvent être comparés à la salive. En effet, par rapport à une solution aqueuse, ils ne sont pas simplement composés de sels et d'eau mais contiennent des protéines en grande quantité, telles que des mucines notamment. Après séchage, les gouttelettes contiennent encore une certaine quantité d'eau, qui est directement liée à l'humidité relative de l'air ; lors de l'évaporation de l'eau, les virus subissent un changement radical d'environnement en passant d'une solution largement aqueuse à un mélange de protéines et de sels faiblement hydratés. Les protéines jouent un rôle important lors du séchage des gouttelettes. Elles peuvent se réticuler ou se gélifier pour former une coquille, comme l'ont rapporté (Vejerano, Marr 2018). Ainsi, la morphologie des noyaux des gouttelettes est principalement dominée par la limite de solubilité des solutés et le rapport du temps de diffusion des particules à l'intérieur de la gouttelette au temps d'évaporation de la gouttelette (Vejerano, Marr 2018). C'est important car les noyaux humides de ces gouttelettes servent de supports dans lesquels les virus enveloppés peuvent rester infectieux.

Merhi et al. ont montré qu'en assimilant, le fluide respiratoire à de la salive, le rapport de taille entre la gouttelette initiale et la gouttelette séchée est presque constant autour de 0,2 sur une gamme d'humidité relative entre 0 et 75% (Merhi et al. 2022), en accord avec Lieber, Basu et al. (Lieber et al. 2021; Basu et al. 2020)

contrairement aux prédictions sur des mélanges idéaux d'eau pure (Netz 2020). Ainsi, sur la plage de 0 à 75%, l'humidité relative n'a pas d'impact significatif sur la taille des gouttelettes à l'équilibre. En effet, ces auteurs ont mis en évidence que l'évaporation de l'eau est entravée par un gradient de concentration en solutés qui s'accumulent à l'interface air/liquide qui est négligeable lors de l'évaluation du temps de sédimentation des aérosols mais qui diminue la viabilité des virus.

Dans un aérosol, l'évaporation a lieu jusqu'à atteindre la taille d'équilibre des gouttelettes. L'évaporation augmente ainsi le temps de sédimentation en réduisant la masse des gouttelettes (Rezaei, Netz 2021a).

2.2. Phase de sédimentation

Le modèle de Wells supposait que les gouttelettes étaient isolées, c'est-à-dire qu'elles n'avaient aucune interaction avec les champs proches de vitesse, de température et d'humidité autour de la gouttelette, ce qui est loin d'être le cas dans la réalité (Wells 1934). En effet, l'étude de Chong et al. a révélé qu'en particulier la vapeur humide évaporée lors du séchage des gouttelettes ne doit pas être négligée, car l'humidité relative autour de la gouttelette reste élevée pendant tout l'événement respiratoire et par la suite pendant la sédimentation, contribuant fortement à l'extension de la durée de suspension des petites gouttelettes dans l'air (Chong et al. 2021). Ainsi, les gouttelettes restent en suspension dans l'air un certain temps en fonction principalement de leur taille.

Le refroidissement induit par l'évaporation et le séchage des solutés (Rezaei, Netz 2021b) ralentissent le processus d'évaporation, et les gouttelettes à l'équilibre sont encore hydratées (Rezaei, Netz 2021a). En conséquence, les facteurs physico-chimiques qui contrôlent les temps d'évaporation et de sédimentation des gouttelettes jouent un rôle important dans la détermination du risque d'infection par les gouttelettes respiratoires en suspension dans l'air (Rezaei, Netz 2021a). Parmi ces paramètres, l'humidité relative et la fraction volumique initiale du soluté jouent un rôle clé dans la détermination de la taille des noyaux de gouttelettes qui se forment à la fin du processus d'évaporation. Selon des études analytiques (Netz 2020), une augmentation de la fraction volumique initiale du soluté ou de l'humidité relative augmente le rayon d'équilibre final des gouttelettes, ce qui entraîne une réduction du

temps moyen pendant lequel les noyaux des gouttelettes peuvent rester en suspension dans l'air.

2.3. Survie virale

On entend ici par survie du virus, la possibilité de rester infectieux. Sa survie pourrait être compromise par la dénaturation de ses protéines ou bien de son ARN. De plus, les virus enveloppés doivent rester humides pour être pleinement infectieux. Dans le modèle de Wells, les aérosols étaient divisés en gouttelettes rapidement évaporées qui persistent sous forme de noyaux de gouttelettes déshydratées et en gouttelettes liquides qui tombent rapidement ; il n'envisageait aucun mécanisme physique pour la transmission aérienne de virus enveloppés entièrement infectieux (Wells 1934). Or, il semble nécessaire de distinguer deux étapes pour la survie des virus : l'étape de séchage où l'eau s'évapore et l'étape de suspension où l'équilibre thermodynamique est atteint suivant la relation activité/concentration (Merhi et al. 2022).

Lorsqu'elles sont émises, les gouttelettes se déshydratent et le pH diminue. Visiblement, l'augmentation de l'acidité et de la salinité dans les gouttelettes respiratoires qui s'évaporent peut affecter la structure du virus (Vejerano, Marr 2018). L'humidité relative de l'atmosphère et l'état d'hydratation des microgouttelettes ne suffisent pas à expliquer la survie du virus, ce qui indique que le milieu dans lequel le virus est en suspension, et l'association avec les composants moléculaires en particulier, jouent probablement un rôle dans la survie du virus (Fedorenko et al. 2020). Ainsi, l'humidité relative affecte plutôt indirectement la survie par son effet sur les conditions physico-chimiques.

L'étude de Lin et al. soutient que la composition chimique des gouttelettes influence grandement la viabilité des virus enveloppés (Lin, Schulte, Marr 2020). Les pH extrêmes diminuent leur viabilité (Yang, Marr 2012). La présence de protéines, en particulier d'albumine sérique, les protège de l'inactivation. Dans cette étude et celle de Oswin et al., la perte d'infectiosité à humidité relative élevée est compatible avec une élévation du pH des gouttelettes, causée par la volatilisation du CO₂ du tampon bicarbonate dans la gouttelette (Oswin et al. 2022).

Après le séchage, les protéines se déposent principalement en couche dense en périphérie des gouttelettes alors que les sels se cristallisent plutôt au centre. Les virus étant des particules colloïdales, on s'attendrait à ce qu'ils diffusent loin de la couche riche en protéines et soient donc confrontés à des concentrations en sels plus grandes au centre de la goutte de séchage, ce qui nuirait alors à leur survie. Dans l'étude de Merhi et al., même si la taille des gouttelettes utilisées est largement supérieure à celles qui sont pertinentes lors de la transmission aérienne, on peut extrapoler que la réduction de la taille des gouttelettes devrait conduire à une meilleure survie à la fin de l'étape de séchage et donc, que l'étape de séchage n'est pas limitante pour la survie du virus (Merhi et al. 2022). En effet, d'autres expériences ont révélé que les taux de survie étaient similaires à la fin de l'étape séchage. D'après Pease et al., la coque protéique en périphérie des gouttelettes ralentit le séchage donc la gouttelette reste hydratée et les virus entièrement infectieux (Pease et al. 2022).

En ce qui concerne l'étape de suspension, le maintien à l'humidité relative de 0% conduit à une viabilité constante du virus, ce qui contraste avec l'effondrement de la survie observé par Fedorenko et al. au bout de 14 h lors de la dispersion des virus dans de l'eau pure (Fedorenko et al. 2020). Cela suggère un effet protecteur de la salive qui contraste avec une étude récente suggérant que les mucines diminuent plutôt l'infectivité du virus par des interactions avec leurs protéines de pointe (Vejerano, Marr 2018). Or dans cette étude, ils ont utilisé des concentrations de mucine bovine 10 fois plus élevées que le contenu des fluides respiratoires ou de la salive en conditions naturelles. Comme l'avaient montré Morris et al., sans découpler les étapes de séchage et de sédimentation, le pourcentage et la durée de survie des virus enveloppés diminuent si l'humidité relative augmente (Morris et al. 2021). Ainsi, Merhi et al. ont mis en évidence que dans la salive, le rôle des protéines prédomine sur celui des sels dans le comportement global (Merhi et al. 2022). En effet, ils l'expliquent par le fait, d'une part, lorsque la teneur en eau diminue, l'activité de l'eau diminue également, ce qui peut se traduire par une augmentation de la pression osmotique. Avec d'autres effets possibles du soluté sur la diminution de la teneur en eau, tels que les variations de pH ou l'augmentation de la concentration en protéines, cette contribution osmotique devrait diminuer la survie du virus lors de la diminution de l'humidité relative. Pourtant, une autre contribution émerge de leurs données de transport moléculaire. En effet, la diminution de l'humidité relative en dessous d'une

certaine valeur conduit à enfermer les virus dans un environnement figé, ce qui les protège efficacement de la dégradation.

Quant à l'influence de la température, Merhi et al. concluent que l'augmentation de la température est préjudiciable à la survie du virus quelle que soit l'humidité relative, mais elle augmente le temps de suspension des gouttelettes (Merhi et al. 2022).

Considérant que les virus peuvent rester infectieux dans les aérosols pendant des heures (Gratton et al. 2011), la formation de noyaux de gouttelettes peut augmenter considérablement la charge virale infectieuse.

2.4. Efficacité de la transmission

L'efficacité de la transmission virale par aérosol repose sur le temps de suspension des gouttelettes dans l'air contrôlé par l'équilibre entre l'évaporation de l'eau et la sédimentation des gouttelettes ; et sur la survie du virus lors du séchage des gouttelettes.

Merhi et al. apportent une précision quant à la distribution en taille des gouttelettes émises (Merhi et al. 2022) en deux aérosols distincts déjà différenciés dans les travaux de Netz et ses collègues (Netz 2020; Netz, Eaton 2020). L'aérosol est produit par le larynx et anecdotiquement par les bronchioles avec des gouttelettes de 0 à 40 μm qui représentent 77% en nombre mais seulement 0,009% en volume, et dont la composition s'éloigne de la salive avec des concentrations accrues en phospholipides et en protéines. Il reste en suspension de l'ordre de plusieurs heures donc s'accumule dans l'air et augmente la charge virale effective.

Un aérosol produit dans la cavité buccale a des gouttelettes de 40 à 100 μm qui ne représentent que 2,6% en nombre mais 0,15% en volume, et dont la composition est très proche de la salive (Johnson et al. 2011). Ce sont des grosses particules qui sédimentent rapidement et ne restent peu voire pas en suspension dans l'air, seulement de l'ordre de quelques minutes. Pourtant, sa fraction volumique beaucoup plus grande signifie qu'il peut porter une charge virale beaucoup plus élevée (Anand, Mayya 2020).

Dans les deux cas, une augmentation de l'humidité relative est un moyen efficace de réduire l'efficacité de la transmission pour les deux types d'aérosols et devrait être considérée comme un outil d'atténuation. La température est en revanche une variable à double tranchant puisque la diminution de la température diminue le temps de suspension mais augmente la viabilité du virus. La baisse de température est donc préjudiciable à la transmission par l'aérosol laryngé mais plutôt favorable pour les aérosols oraux. Par conséquent, la charge virale de l'aérosol oral devrait être beaucoup plus grande que celle de l'aérosol laryngé, une hypothèse qui doit être tempérée par la variation spatiale de la charge virale le long des voies respiratoires. En effet, le BCoV qui nous intéresse se localise préférentiellement dans les voies respiratoires supérieures donc les aérosols oraux domineraient l'efficacité de la transmission aérienne.

3. Inhalation d'aérosols chargés en virus

Une fois inhalés, les aérosols chargés de virus peuvent se déposer dans les voies respiratoires d'un hôte potentiel. La taille des aérosols est à nouveau essentielle pour déterminer le site de dépôt, bien que de nombreux facteurs anatomiques, physiologiques et aérodynamiques affectent également le modèle de dépôt. L'infection peut être initiée au site de dépôt si le virus reste infectieux et que les récepteurs appropriés sont présents. Les aérosols jusqu'à 100 μm peuvent être inhalés. Selon leur taille, ils se déposent dans différentes régions des voies respiratoires. Lors de l'inhalation, la taille des aérosols inhalés peut augmenter en raison de la croissance hygroscopique dans les voies respiratoires presque saturées (Wang et al. 2021). Le Comité international de protection radiologique (ICRP) a développé un modèle, basé sur l'architecture pulmonaire humaine, qui quantifie l'efficacité du dépôt en fonction de la taille des particules de l'aérosol (Guha, Hariharan, Myers 2014). Les aérosols dont les particules $> 5 \mu\text{m}$ se déposent principalement dans la région nasopharyngée (87 à 95 %) ; bien que des aérosols $< 5 \mu\text{m}$ s'y déposent également, ils peuvent également pénétrer plus profondément dans les poumons et se déposer dans la lumière alvéolaire. Les aérosols porteurs d'une charge électrostatique naturelle peuvent être attirés par les parois des voies respiratoires (Liyuan et al. 2016). À condition qu'un récepteur cellulaire soit présent au site de dépôt, l'infection peut alors débiter.

IV. Méthodes actuelles appliquées à la collecte virale dans l'air et combinaison avec les méthodes de détection ultérieures

1. Enjeux de la collecte virale en suspension dans l'air

L'échantillonnage de virus en suspension dans l'air est techniquement difficile pour plusieurs raisons. Cela tient notamment à l'efficacité limitée de certaines méthodes d'échantillonnage pour la collecte de particules fines, la déshydratation des particules biologiques et virales lors de la collecte, et les dommages aux virus dus aux forces d'impact entraînant une perte de viabilité (Fronczek, Yoon 2015), la ré-aérosolisation du virus lors de la collecte et les pertes dues à la rétention dans l'équipement d'échantillonnage (Pan, Lednicky, Wu 2019). De plus, les virus présents dans les gouttelettes et les aérosols sont difficiles à détecter car ils sont généralement présents à des concentrations extrêmement faibles, ce qui oblige à échantillonner des très grands volumes d'air, de l'ordre du mètre cube, pour obtenir des résultats d'analyse fiables (Borges et al. 2021; Breshears et al. 2022). Il existe un autre problème lié à l'intégrité virale ; celle-ci doit être maintenue si l'on souhaite estimer de façon fiable l'infectiosité virale à partir de l'air (Borges et al. 2021). Par ailleurs, la plupart des analyses de laboratoire disponibles peuvent se réaliser sur un prélèvement sec ou liquide, à condition qu'il soit possible de remettre en suspension ou en solution les particules à analyser dans les prélèvements secs.

Il existe actuellement plusieurs types de collecteurs permettant des analyses de bioaérosols. Dans la suite de ce travail, de façon délibérée, nous présenterons uniquement les grands principes de collecte des virus dans l'air et quelques prototypes, de façon non exhaustive, souvent développés en médecine humaine et déjà étudiés ou pouvant facilement être adaptés pour les bovins.

Le processus de prélèvement des bioaérosols se déroule en deux étapes. (1) L'échantillonnage est mesuré en fonction du débit (L/min). Un débit élevé permet de mettre un plus grand volume d'air en contact avec le dispositif de collecte et améliore ainsi la probabilité de détection (Chen, Yao 2018) ; mais cela peut affecter la

viabilité des virus en raison des forces de cisaillement. Le débit influe également sur la durée du prélèvement pour atteindre un volume de collecte suffisant. (2) La collecte est mesurée par l'efficacité de la collecte (75%). Quelle que soit la méthode de collecte, il faut éviter la surcharge de particules qui rend l'identification difficile entraînant une sous-estimation, voire possiblement une identification non spécifique.

2. Collecteurs à inertie

Les collecteurs à inertie permettent de recueillir les aérosols par impaction ou dépôt sur un milieu adapté, qui peut être un milieu liquide ou solide.

L'appareil d'impaction doit avoir une grande vitesse d'impact sur le milieu de collecte, c'est-à-dire une vitesse d'entrée de l'air dans le dispositif de collecte, assez grande pour permettre la capture de particules viables à partir de 1 μm de diamètre au moins. Cette vitesse doit toutefois, ne pas dépasser une certaine limite pour éviter la dégradation des particules viables qui sont fragiles.

2.1. Impacteurs sur milieu solide

Les impacteurs sur milieu solide regroupent les échantillonneurs de type Andersen, à fentes et cycloniques. Ils sont généralement plus efficaces pour capturer des grosses particules (Verreault, Moineau, Duchaine 2008).

Les échantillonneurs de type Andersen et à fente accélèrent les particules à travers des orifices ou des fentes étroites grâce à une pompe à vide qui aspire l'air (Borges et al. 2021). Le flux d'air change brusquement de direction et l'inertie des particules les détourne du flux d'air et les impacte sur la surface, qui contient généralement une boîte de Pétri avec un milieu de culture. Le milieu est soit lavé pour collecter les particules, soit utilisé directement. Pour ces impacteurs, le diamètre de coupure de la fente permet de cibler certaines tailles de particules. Si l'impacteur possède plusieurs étages en cascade, en diminuant successivement les tailles des buses, les particules sont collectées à différents étages selon leur taille (Pan, Lednicky, Wu 2019). L'échantillonneur Andersen classique à six étages récupère des particules allant de 0,65 μm de diamètre sur l'étage le plus bas à 7,5 μm et plus, sur l'étage

supérieur (Andersen 1958). Avec, les collecteurs à fente, ils sont principalement utilisés pour déterminer les concentrations de bactéries dans les aérosols en fonction du temps (Harrison, Hester 2019). Néanmoins, des collecteurs à fente ont été utilisés avec une couche liquide sur le milieu de culture pour collecter les virus. Les particules qui impactent la surface solide sont immédiatement remises en suspension dans un milieu liquide pour maximiser la récupération des virus infectieux et des acides nucléiques viraux (Booth et al. 2005; Lindsley et al. 2017).

L'impacteur en cascade Sioutas (SKC Ltd) sépare et collecte les particules en suspension dans l'air grâce à cinq niveaux d'impaction à fente : $> 2,5 \mu\text{m}$, $1,0 \mu\text{m}$ à $2,5 \mu\text{m}$, $0,50 \mu\text{m}$ à $1,0 \mu\text{m}$, $0,25 \mu\text{m}$ à $0,50 \mu\text{m}$ et $< 0,25 \mu\text{m}$. Il est utilisé avec une pompe d'échantillonnage au débit de 9 L/min. Les particules au-dessus de chaque point de coupure sont collectées sur un filtre en PTFE de 25 mm à chaque étage successif. Les particules inférieures au point de coupure de $0,25 \mu\text{m}$ du dernier étage sont collectées sur un filtre en PTFE de 37 mm. Les échantillons sont alors fractionnés en fonction de la taille et peuvent être analysés séparément.

Les collecteurs à force centrifuge ou cycloniques. Errington et Powell ont développé des séparateurs cycloniques qui accélèrent l'air en utilisant un vortex centrifuge, poussant les particules en suspension dans l'air en contact avec une surface solide en utilisant l'inertie des particules (Errington, Powell 1969). Un liquide de lavage est constamment injecté dans le cyclone et collecté dans une bouteille située à sa base. Malgré les progrès réalisés dans la conception des cyclones, les tailles seuils de ces dispositifs (généralement $> 1 \mu\text{m}$) ne peuvent pas répondre aux exigences d'échantillonnage pour les particules contenant des virus de petite taille (Pan, Lednicky, Wu 2019). De plus, les dommages physiques résultant de l'action des cyclones peuvent inactiver les virus, entraînant une sous-estimation du titre de virus infectieux dans les échantillons collectés (Bourgueil et al. 1992).

Le collecteur à deux étages cycloniques TE-BC251 de NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) est l'impacteur sur milieu solide le plus utilisé dans les études récentes pour détecter le SARS-CoV-2 en médecine humaine (Chia et al. 2020; Ge et al. 2020; Lane et al. 2020). Associé à une pompe, il peut collecter à un débit de 2 à 30 L/min. Il est constitué de deux étages avec des tailles de coupure respectives de $2,1 \mu\text{m}$ et $0,41 \mu\text{m}$, la 2^{ème} paroi étant en polycarbonate.

A**B**

Figure 4 : (A) Impacteur à fente à 5 étages Sioutas (SKC Ltd). (B) Impacteur à 2 étages cycloniques BC251 (NIOSH).

Ce type d'impacteur ne convient pas vraiment au prélèvement de nanoparticules. En raison des forces de cisaillement provoquées par les échantillonneurs à haut débit, la viabilité du virus peut également devenir un problème pendant le processus d'impaction (Breshears et al. 2022). Des échantillonneurs à faible débit peuvent être utilisés pour maintenir la viabilité du virus, mais cela diminuera l'efficacité de la collecte.

D'autres types d'impacteurs sur milieu solide sont ceux utilisés pour collecter le pollen, pour lesquels la culture n'est pas une option. Un type, l'échantillonneur Rotorod (Frenz, Lince 1997), impacte directement le pollen sur des tiges de polystyrène enduites d'adhésif. Cela pourrait être une alternative intéressante à explorer pour la collecte de virus, mais actuellement aucun article n'adopte cette approche particulière.

2.2. Impacteurs sur milieu liquide

Les impacteurs sur milieu liquide sont les collecteurs les plus couramment utilisés pour collecter des virus en aérosol, car le milieu de collecte liquide aide à préserver la viabilité du virus (Pan, Lednicky, Wu 2019). Décrits pour la première fois par May et Harper (May, Harper 1957), ils fonctionnent de façon similaire aux impacteurs sur milieu solide, sauf que les particules en suspension dans l'air sont projetées à travers un orifice étroit immergé dans un liquide (Breshears et al. 2022). Le milieu de collecte liquide recommandé pour le prélèvement d'aérosols contenant des virus est le tampon phosphate salin (Borges et al. 2021). La formation de petites

bulles dans le liquide de l'impacteur peut également permettre d'augmenter l'efficacité de la collecte de très petites particules par diffusion. Cependant, la ré-aérosolisation des particules en raison des propriétés de piégeage des bulles d'air peut poser problème, notamment pour les particules hydrophobes (Verreault, Moineau, Duchaine 2008).

Ce type d'impacteur comprend les impacteurs tout en verre (AGI), le BioSampler® (SKC Ltd) et le Coriolis® (Bertin Technologies). Par rapport à l'AGI, au lieu de forcer l'air à vitesse sonique à travers une seule buse dirigée vers la base du flacon, le BioSampler dispose de trois buses soniques tangentielles. Le liquide de collecte dans le flacon se déplace dans un mouvement tourbillonnant pendant l'échantillonnage (Verreault, Moineau, Duchaine 2008).

En particulier, le biocollecteur monocyclonique Coriolis® (Bertin Technologies) peut collecter 100% des particules de taille inférieure à 4,4 μm . La technologie se base sur celle décrite précédemment pour les cyclones, combinée à un débit d'air élevé (Zhou et al. 2021). L'air est aspiré dans un cône contenant au préalable un liquide de collecte adapté via un mouvement tourbillonnant comparable au vortex. Les particules sont projetées sur les parois humides par la force centrifuge qui s'exerce dans le cône grâce au cyclone, séparées de l'air et récupérées dans l'échantillon liquide de solution tampon (souvent une solution saline à 0,9%). Le fonctionnement de ce collecteur est basé sur des mouvements cycloniques à très haut débit, de 200 à 300 L/min, avec une vitesse optimale d'entrée dans le cyclone pour garantir une haute efficacité de séparation des particules microscopiques. L'avantage du Coriolis est qu'il est conçu pour aspirer toutes les particules respirables et non respirables (< 15 μm de diamètre), avec l'usage d'un cyclone unique. Une étude réalisée en 2008 tendant à étudier les performances du Coriolis® pour collecter des spores et des grains de pollen, a démontré l'efficacité physique du collecteur pour collecter des micro-organismes présents dans des aérosols de taille variable, en comparant les résultats à ceux obtenus avec des filtres à particules utilisés classiquement pour l'étude des bioaérosols (Carvahlo et al., 2008). L'efficacité de prélèvement (capacité de la machine à récolter les particules, égale aux nombres de particules récupérées sur le nombre total de particules aérosolisées dans la pièce) pour les différentes tailles de particules variait comme suit : entre 40 et 50 % pour les particules de moins de 4 μm , 84% pour les particules de 4 à 6 μm et 92% pour les particules de 10 μm .

A**B**

Figure 5 : Impacteurs sur milieu liquide. (A) Modèle BioSampler (SKC Ltd). (B) Modèle Coriolis® (Bertin Technologies).

La collecte en milieu liquide empêche la dessiccation des virus en suspension dans l'air et facilite l'extraction du matériel génétique pour une analyse ultérieure (Verreault, Moineau, Duchaine 2008). Mais là encore, les forces de cisaillement dans le liquide turbulent peuvent entraîner une diminution de la viabilité (Breshears et al. 2022).

3. Collecteurs à filtration

Étant donné que la plupart des collecteurs à inertie ne peuvent pas piéger efficacement les particules d'une taille nanométrique, les filtres sont fréquemment utilisés pour échantillonner les virus en suspension dans l'air (Verreault, Moineau, Duchaine 2008). Ils peuvent être précédés d'ouvertures sélectives de la taille des particules, telles qu'un cyclone ou un impacteur, pour éliminer les particules plus grosses et fournir des classifications granulométriques des bioaérosols (Lindsley et al. 2017).

18/10/2023 14:30:00L'efficacité du filtre est basée sur plusieurs mécanismes qui permettent la collecte des particules : l'interception, l'impaction inertielle, la diffusion, la sédimentation gravitationnelle et l'attraction électrostatique (Hinds, Zhu 1998). L'interception se produit lorsqu'une particule suit la ligne de courant en

contournant un obstacle mais, en raison de sa taille, entre en contact et est interceptée par l'obstacle. C'est le seul mécanisme qui ne dépend pas du détournement des particules du courant. L'impaction inertielle se produit lorsqu'une particule heurte un obstacle lorsque la ligne de courant change de direction. L'inertie de la particule l'oblige à s'écarter de la ligne de courant et à percuter une surface. Seules de très petites particules sont affectées par le mécanisme de diffusion. La sédimentation gravitationnelle affecte principalement les particules de diamètre aérodynamique beaucoup plus grand en les poussant vers le bas en raison de la gravité. L'importance de cette force dépend des autres forces qui affectent la particule dans diverses directions. Enfin, les forces électrostatiques influencent également la trajectoire des particules. Ce mécanisme dépend de la taille et de la charge de la particule ainsi que de la différence de charge avec le filtre.

De nombreux types de filtres ont été utilisés pour échantillonner les virus en suspension dans l'air. Ils diffèrent principalement par leur composition. À notre connaissance, les premiers filtres utilisés pour échantillonner les virus en suspension dans l'air étaient fabriqués à partir de coton entremêlé (Meiklejohn et al. 1961), des filtres en cellulose de 0,45 μm (Sawyer et al. 1994; Aintablian, Walpita, Sawyer 1998), des filtres en polytétrafluoroéthylène (PTFE ou téflon®) de 2 μm (Myatt et al. 2004; Jonges et al. 2015), en polycarbonate de 0,1 μm (McCluskey, Sandin, Greene 1996). Les filtres les plus couramment utilisés sont composés de gélatine (Liu et al. 2020; Razzini et al. 2020; Rodríguez et al. 2021; Dumont-Leblond et al. 2020) ou de fibre de verre (Barbieri et al. 2021; Stern, Al-Hemoud, et al. 2021; Stern, Koutrakis, et al. 2021). L'efficacité de collecte physique des filtres en gélatine et en PTFE, calculée en plaçant des compteurs de particules avant et après les filtres, dépasse 96 % (Burton, Grinshpun, Reponen 2007).

Parmi les filtres couramment utilisés, le filtre en gélatine est unique dans le sens où il peut être dissous dans un liquide, pour le dénombrement viral en cultures cellulaires sans affecter de manière significative la viabilité de nombreux virus. Les conditions d'échantillonnage sont très importantes pour une collecte de virus réussie sur des filtres en gélatine ; une faible humidité relative peut conduire à la dessiccation des virus et une humidité relative élevée à la dissolution des filtres de gélatine (Verreault, Moineau, Duchaine 2008). Ainsi, les virus collectés par filtre sont

généralement plus adaptés aux analyses moléculaires qu'aux évaluations du pouvoir infectieux, car les processus de dessiccation, d'extraction et de post-échantillonnage inactivent de manière significative une fraction des virus infectieux (Tseng, Li 2005; Burton, Grinshpun, Reponen 2007).

Les filtres sont actuellement utilisés principalement en complément d'un collecteur à inertie, mais il y a deux exemples pertinents de filtres simples présentés ci-après.

L'échantillonneur IOM (SKC Ltd) est utilisé dans le monde entier pour échantillonner des aérosols en fraction inhalable par prélèvement individuel (Mark, Vincent 1986). Les particules sont aspirées dans le dispositif à travers un orifice d'entrée circulaire de 15 mm, sous un débit d'aspiration de 2 à 5 L/min permis par une pompe. Le capteur comprend une cassette interne en plastique avec le filtre de gélatine de 25 mm d'épaisseur. La plupart des particules passant par l'orifice d'entrée sont captées par le filtre, le reste se dépose sur les parois intérieures de la cassette. Avec ce collecteur, au débit de 2 L/min, 50% des particules recueillies mesurent moins de 4 µm de diamètre.

Le capteur Button Sampler (SKC Ltd) est intéressant dans la collecte de particules inhalables par sa capacité à ne pas suréchantillonner de très grosses particules (Aizenberg, Reponen, et al. 2000; Aizenberg, Grinshpun, et al. 2000). Les particules sont aspirées par une pompe dans l'échantillonneur à un débit de 4 L/min et recueillies sur un filtre de 25 mm de diamètre. Il est constitué d'une surface hémisphérique incurvée à tamis métallique en acier inoxydable, qui présente des pores uniformément espacés. Pour l'échantillonnage de bioaérosols, un filtre à membrane en gélatine ou en polycarbonate est ajouté, de 25 mm d'épaisseur avec des pores d'un diamètre supérieur à 1 µm. La proximité du filtre par rapport à l'entrée minimise les pertes de transmission et assure une répartition égale de la charge de particules, et une faible variation entre les échantillons.

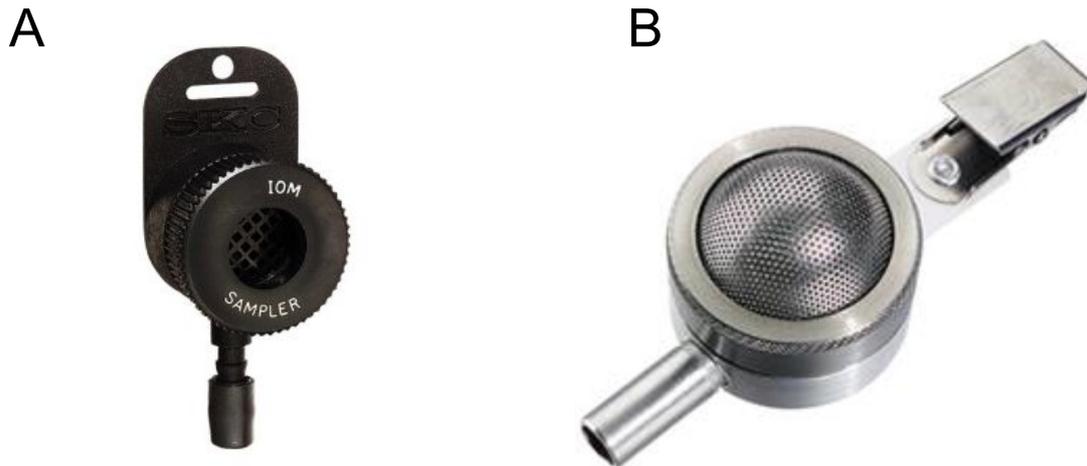


Figure 6 : Collecteurs à filtration sur filtre en gélatine. (A) Modèle IOM. (B) Modèle Button Sampler. Source : SKC Ltd

L'avantage de ce type de collecteur est sa très haute efficacité d'échantillonnage pour tous les types de particules, notamment les nanoparticules. Les particules peuvent être difficiles à extraire des filtres, à l'exception des filtres en gélatine (Verreault, Moineau, Duchaine 2008). Par ailleurs, la filtration, d'autant plus que le débit est élevé, exerce une chute de pression élevée après le filtre qui peut affecter la viabilité des virus en causant des dommages structurels. De plus, les procédés de filtration sont susceptibles de déshydrater les virus lors de l'échantillonnage (Verreault, Moineau, Duchaine 2008). Même s'ils causent plus de dommages aux virus que d'autres méthodes, les filtres sont efficaces pour déterminer le contenu viral des aérosols (Lindsley et al. 2017).

4. Collecteurs à précipitation électrostatique

Ce type de collecteur combine une pompe à air couplée à la précipitation électrostatique (Fronczek, Yoon 2015). Le principe physique de la précipitation électrostatique repose sur une décharge électrique, appelée décharge corona (Hinds, Zhu 1998). Elle produit des ions, qui sont captés par les particules en suspension dans l'air. Le vent ionique produit par la décharge électrique fournit un flux d'air de 4,5 L/min qui entraîne par la force électrique les particules vers l'électrode collectrice. Le rinçage de cette dernière avec une solution aqueuse adaptée permet de transférer les particules capturées en phase liquide.

Cette technologie a été utilisée et mise au point dans un dispositif de collecte des bioaérosols par le CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives) : le Biodosi® (Roux et al. 2014; 2016). Les particules sont collectées sur une surface sèche afin de pouvoir ensuite être concentrées dans une petite quantité de milieu liquide à analyser. Il est démontré que près de 98 % des particules en suspension dans l'air de 10 nm à 3 µm sont collectées. Ainsi, l'avantage de cette technologie est sa très haute efficacité d'échantillonnage. L'échantillonnage n'est pas limité dans le temps, et même un échantillonnage continu est possible.



Crédit photo: L. Godart

Figure 7 : Collecteur Biodosi (Roux et al. 2014).

Ce procédé permet d'utiliser un faible débit. Hong et al. ont développé un concentrateur de particules électrostatique personnel avec des efficacités de collecte très élevées, supérieures à 99%, pour des particules de polystyrène de 0,05 à 2 µm de diamètre en utilisant un très faible débit de 1,2 L/min (Hong et al. 2016). Cette technique a non seulement atteint une efficacité de collecte élevée, mais a également eu un taux de récupération 900 fois supérieur à celui du BioSampler commercial (SKC Ltd), qui utilise un débit plus élevé de 12,5 L/min. De plus, les micro-organismes capturés sont toujours vivants ; elle est donc compatible avec la culture d'agents pathogènes. Ces dispositifs se sont avérés fructueux pour les bactéries et les particules de polystyrène de 0,6 à 2,1 µm (Choi et al. 2017).

La précipitation électrostatique peut être limitée pour la collecte de particules submicroniques dont les virus qui nous intéressent (Pan, Lednicky, Wu 2019). C'est pourquoi, des méthodes d'enrichissement complémentaires sont nécessaires à la collecte. Les exemples les plus fréquemment rapportés dans les articles récents sont décrits ci-dessous. L'utilisation combinée de la microfluidique et de l'échantillonnage basé sur la précipitation électrostatique offre des efficacités de collecte comparables à celles des impacteurs commerciaux (Pardon et al. 2015). Ladhani et al. ont utilisé la précipitation électrostatique pour améliorer l'efficacité de la collecte de leur dispositif microfluidique (Ladhani et al. 2017). Le prototype dynamique de Breshears et al. a montré une efficacité de collecte maximale de 21 % à partir de petits échantillons de 300 μL (Breshears et al. 2022). Comparés au taux constant de 19 % d'un impacteur commercial à partir d'échantillons de 4 ml, ces résultats semblent compétitifs. Sans la précipitation électrostatique, l'efficacité de la collecte était inférieure à 1 %. Bien que ce dispositif n'ait pas été testé directement sur des virus en aérosol, ses recherches sur l'efficacité de la précipitation électrostatique et le potentiel de collecte microfluidique sont intéressantes et applicables à des recherches plus approfondies. Certains auteurs ont également utilisé d'autres méthodes d'enrichissement que la microfluidique pour augmenter la concentration des particules collectées et améliorer la détection ultérieure. En particulier un enrichissement par la dissolution des aérosols en hydrosols (ATH) à l'aide de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (Kim, An, Hwang 2020). Piri et al. ont également utilisé la même méthode d'enrichissement couplée à la précipitation électrostatique à l'aide d'acide ascorbique dissous dans une solution saline tamponnée au phosphate pour échantillonner des bioaérosols. Ils ont relevé une capacité de survie virale accrue par rapport à la précipitation électrostatique seule (Piri et al. 2021).

5. Combinaison de ces méthodes avec la détection virale

Depuis que l'intérêt des dispositifs microfluidiques a été démontré, assez largement, pour les applications de biocapteurs, des dispositifs intégrés ont été développés pour effectuer à la fois l'échantillonnage et la détection des particules virales en suspension dans l'air, bien que le nombre de ces travaux soit encore faible dans le cadre de la détection du SARS-CoV-2 (Breshears et al. 2022).

Lee et al. ont couplé un filtre en fibre de verre échantillonné 15 minutes à 100 L/min à une bandelette de test immunochromatographique à flux latéral (LFA). L'efficacité pourrait cependant être améliorée par une étape d'élution (Lee et al. 2020). Su et al. souligne que des particules virales ont été détectées dans des échantillons d'air analysés grâce à un filtre ou un impacteur puis une RT-PCR (Su, Sutarlie, Loh 2020). Piri a couplé la précipitation électrostatique, à un enrichissement ATH et une détection par culture ou par ELISA ou par PCR quantitative (Piri et al. 2021). Kim et al. ont couplé la précipitation électrostatique avec un enrichissement ATH puis une détection par qPCR (Kim, An, Hwang 2020). Xiong et al. ont couplé la microfluidique à un système de fluorescence et une détection par LAMP. Ce prototype a révélé une sensibilité de détection comparable à la qPCR et une spécificité de 100% lors de tests sur des échantillons cliniques (Xiong et al. 2021). C'est d'ailleurs le seul prototype qui a été testé sur des échantillons cliniques. Ainsi, les technologies les plus prometteuses pour la détection des virus sont la LAMP et la PCR quantitative.

V. Le coronavirus bovin et son rôle pathogène respiratoire chez les bovins

Parmi les agents viraux responsables de MRB, le coronavirus bovin (BCoV) est un bon modèle infectieux pour évaluer les méthodes non invasives de collecte virale dans l'air décrites précédemment. En effet, il est fréquemment isolé en routine bien que les connaissances épidémiologiques, le rôle pathogène respiratoire et les outils de maîtrise sont moins développés que pour les autres virus responsables de MRB.

Par ailleurs, le BCoV possède des caractéristiques intéressantes qui font de lui un candidat propice à l'infection expérimentale. En particulier, il infecte essentiellement l'épithélium des cavités nasales donc est potentiellement excrété dans l'air exhalé. Il est faiblement pathogène à lui seul, ce qui permet en cas d'infection expérimentale de suivre les bovins sur plusieurs jours sans altération critique de leur état de santé. Il n'est pas pathogène pour l'homme afin de pouvoir manipuler sans risque les animaux après l'infection. Enfin, le modèle d'infection expérimentale est peu développé.

Dans la suite de cette partie, les caractéristiques virales essentielles du BCoV sont détaillées.

1. Découverte et histoire du virus

Le BCoV a été découvert accidentellement par Mebus et ses collègues à l'Université du Nebraska en 1972, au cours d'une étude visant à évaluer l'efficacité d'un vaccin contre le rotavirus pour réduire la diarrhée chez le veau (Mebus et al. 1972). Suite à l'apparition de troubles diarrhéiques dans des élevages pourtant vaccinés contre le rotavirus qui était supposé être le principal agent responsable, le groupe a identifié la présence d'un coronavirus dans les matières fécales ; qu'ils ont étudié plus précisément (Mebus et al. 1973). Les années suivantes, le BCoV a été reconnu comme une cause fréquente de diarrhée chez le veau (Woode, Bridger, Meyling 1978).

En 1982, d'autres travaux de ont impliqué le BCoV comme agent pathogène respiratoire en inoculant du matériel provenant d'échantillons respiratoires sur des

veaux atteints d'une maladie respiratoire naturelle à des veaux gnotobiotiques (Thomas et al. 1982). Le BCoV a ensuite été décrit en microscopie électronique dans des échantillons respiratoires de veaux infectés expérimentalement (Thomas et al. 1982). Ces études ont également fourni la première indication que les deux BCoV associés soit à la diarrhée, soit à l'infection respiratoire étaient en réalité une seule et même entité, ou du moins qu'ils appartenaient au même genre viral. Peu de temps après, plusieurs études ont étudié la parenté des BCoV responsables de différentes formes cliniques chez les bovins (Tsunemitsu, Saif 1995).

2. Taxonomie

Les coronavirus sont les seuls membres de la sous-famille des Coronavirinae au sein de la famille des Coronaviridae, dans l'ordre des Nidovirales . Traditionnellement, les coronavirus étaient classés en trois groupes en fonction de leurs propriétés antigéniques et génétiques (Brian, Baric 2005). Cependant, ces groupes ont été récemment remplacés par quatre genres : Alpha, Beta, Gamma et Deltacoronavirus. Les deux premiers genres ne comprennent que des coronavirus de mammifères, tandis que tous les coronavirus aviaires sont membres des deux autres genres (King et al. 2012). Le changement est justifié par une démarcation insuffisante dans les domaines de la réplicase 1ab (au moins 10 %) pour justifier une espèce distincte.

Le BCoV appartient au genre des Betacoronavirus. Plus précisément, il appartient à l'espèce virale Betacoronavirus 1 de la lignée A (King et al. 2012). Il est étroitement lié au virus de l'encéphalomyélite hémagglutinante porcine (PHEV) (Vijgen et al. 2006), au coronavirus respiratoire canin (CRCoV) (Erles et al. 2003), au coronavirus équin et au coronavirus humain du rhume (Human coronavirus OC43, HCoV-OC43) et HKU1 (Saif 2010a; Vijgen et al. 2006).

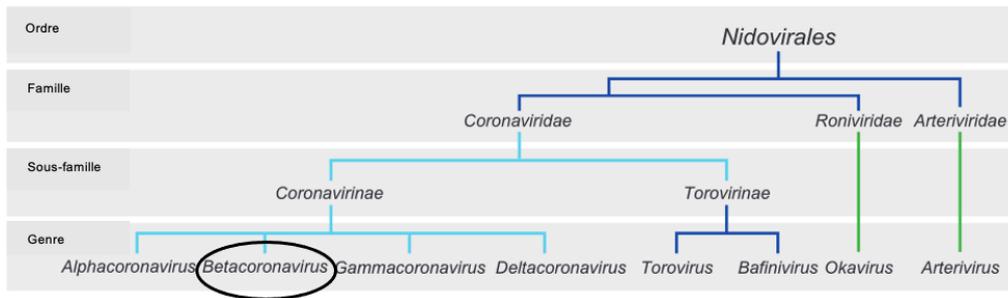


Figure 8 : Taxonomie actuelle des Coronaviridae selon le Comité international de taxonomie des virus (Coronaviridae 2017).

3. Caractéristiques virales

Les coronavirus sont des virus à ARN enveloppés, pléomorphes quasiment sphériques (Clark 1993). Leur taille peut varier de 80 à 160 nm de diamètre (Clark 1993). Ils disposent de spicules distincts de 20 nm en forme de pétales ou de pointes faisant saillie uniformément, circonférentiellement à partir de l'enveloppe. Certains coronavirus, dont le BCoV, ont une frange secondaire de pointes plus petites de 5 nm (Clark 1993). En microscopie électronique, l'apparence générale des particules virales rappelle la couronne solaire, d'où le nom de « *Corona* » pour les virologues (Estola 1970).

Son génome est constitué d'un ARN monocaténaire à polarité positive, de 27 à 32 kb codant pour cinq protéines structurales majeures (Clark 1993). Parmi celles-ci, on retrouve une protéine nucléaire, la nucléocapside (N) ; par sa forme hélicoïdale, elle est associée au génome et elle est hautement conservée entre les souches, d'où son utilisation fréquente comme cible des tests de détection de l'ARN viral. Les protéines de surface, constituant les spicules macroscopiques, dont la glycoprotéine hémagglutinine-estérase (HE) et la glycoprotéine S, sont hétérodimériques (Clark 1993) et impliquées dans la fixation aux récepteurs des cellules hôtes et l'hémagglutination des érythrocytes, respectivement (Ellis 2019; Saif 2010b); elles contiennent des épitopes qui sont les principales cibles des réponses immunitaires, notamment de la réponse anticorps. Les protéines transmembranaires, M et E, aident à l'assemblage de la particule virale. Des protéines accessoires non structurales, dont le nombre est variable selon les souches (4 à 8), inhibent la réponse immunitaire innée médiée par les interférons ; elles n'ont néanmoins pas été étudiées précisément pour le BCoV.

Le récepteur de la cellule hôte du coronavirus bovin est l'acide sialique, ce qui reflète le large tropisme de ce virus et explique la présence d'un gène HE dans le virus (*Coronaviridae* 2017). Le BCoV se fixe à l'acide sialique (N-acétyl-9-O-acétylneuraminique) via les protéines HE et S pour initier l'infection (Schultze et al. 1991; Schultze, Herrler 1992; 1994). On suppose en outre qu'après la liaison initiale aux récepteurs contenant de l'acide sialique, la protéine S peut interagir avec un récepteur cellulaire spécifique qui conduit à un changement de conformation et à la fusion des membranes virale et cellulaire (Schultze, Herrler 1994).

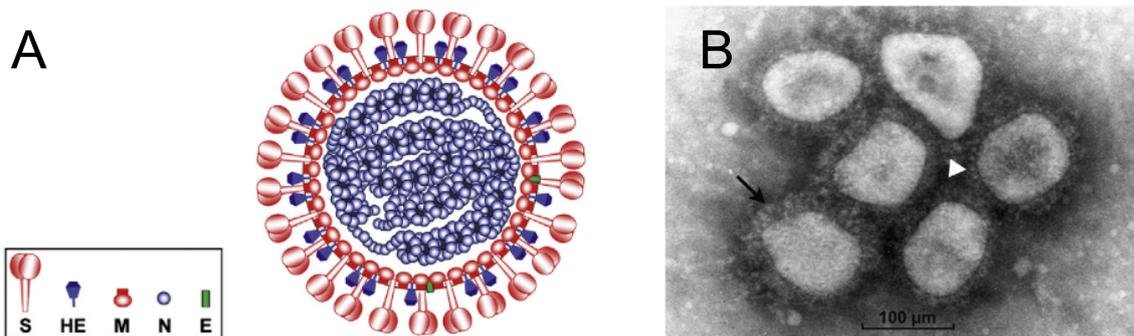


Figure 9 : Le coronavirus bovin. (A) Représentation schématique d'un bêtacoronavirus (Coronaviridae 2017). (B) Microscopie électronique immunitaire du BCoV respiratoire adapté à la culture tissulaire (Saif 2010). Les particules ont réagi avec les antisérums contre le BCoV, montrant une surface HE plus courte (tête de flèche blanche) et des pointes S plus longues (flèche noire). La barre équivaut à 100 μm.

L'enveloppe contenant des lipides rend ces virus sensibles dans l'environnement extra-corporel, en particulier aux détergents non ioniques, au formaldéhyde, aux agents oxydants, aux rayonnements UV et aux solvants lipidiques (éther, chloroforme) ; il est inactivé par les désinfectants conventionnels, tels que le formol et la chaleur (Clark 1993; Saif 2010b).

Les BCoV appartiennent à l'ordre des Nidovirales (du latin *nidus*, nid), qui fait référence à leur schéma répliatif complexe, impliquant des « nids » d'ARN sous-génomiques (*Coronaviridae* 2017). Mis à part les détails moléculaires, ce schéma répliatif très sujet aux erreurs, ainsi que la possibilité de recombinaison entre les isolats, entraînent une mutabilité élevée, faisant du BCoV, comme les autres coronavirus, des cibles en mouvement rapide. D'après Zhang et al., les isolats entériques de BCoV sont plus sujets aux changements génétiques et peuvent muter pour ressembler aux souches respiratoires de BCoV après le passage en culture tissulaire (Zhang et al. 2007).

4. Formes cliniques liées à l'infection par le BCoV

Les coronavirus bovins sont responsables d'infections intestinales et respiratoires chez les bovins et les ruminants sauvages. Ils infectent donc l'intestin et les voies respiratoires aussi bien dans la partie supérieure que pulmonaire. On distingue trois formes cliniques chez les bovins :

- **L'entérite néonatale du veau** survient généralement dans les 3 premières semaines de vie (Clark 1993; Boileau, Kapil 2010) mais peut survenir chez le veau jusqu'à l'âge de 3 mois. La sévérité de la diarrhée et de la déshydratation dépend de la dose infectante ainsi que de l'âge et de l'état immunitaire du veau. Les co-infections avec d'autres agents pathogènes entériques tels que le rotavirus, le torovirus, les cryptosporidies et les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) ou entéropathogènes (EPEC) sont courantes ; leurs effets additifs ou synergiques augmentent la sévérité de la diarrhée.
- Le BCoV a également été impliqué comme la cause de la **dysenterie hivernale des bovins adultes**, une maladie entérique aiguë sporadique. Présente dans le monde entier, elle est particulièrement fréquente pendant les mois d'hiver, comme son nom l'indique. La dysenterie hivernale se caractérise par une diarrhée explosive, souvent sanglante, accompagnée d'une diminution de la production de lait, de dépression, d'anorexie et de signes respiratoires fréquents. Le taux de morbidité varie de 20 % à 100 % dans les troupeaux atteints, mais le taux de mortalité est généralement faible (1,2 %) (Benfield, Saif 1990; Tsunemitsu, Smith, Saif 1999; Saif 1990; Tsunemitsu, Saif 1995).
- Des **infections respiratoires** causent chez des **bovins de différents âges** une maladie respiratoire bénigne (toux, rhinite), ou très rarement une pneumonie en l'absence de co-infection (Thomas et al. 1982; McNulty et al. 1984; Reynolds et al. 1985; Saif et al. 1986; Heckert et al. 1990a; 1991; Tsunemitsu et al. 1991; Clark 1993; Thomas et al. 1982; Cho, Hoet, et al. 2001; Hasoksuz, S. Lathrop, et al. 1999; Hasoksuz, S. L. Lathrop, et al. 1999; Heckert et al. 1990a; Lathrop, Wittum, Brock, et al. 2000; Lathrop, Wittum, Loerch, et al. 2000; Storz, Lin, et al. 2000; Storz, Purdy, et al. 2000; Storz et al. 1996; Hasoksuz et al. 2002).

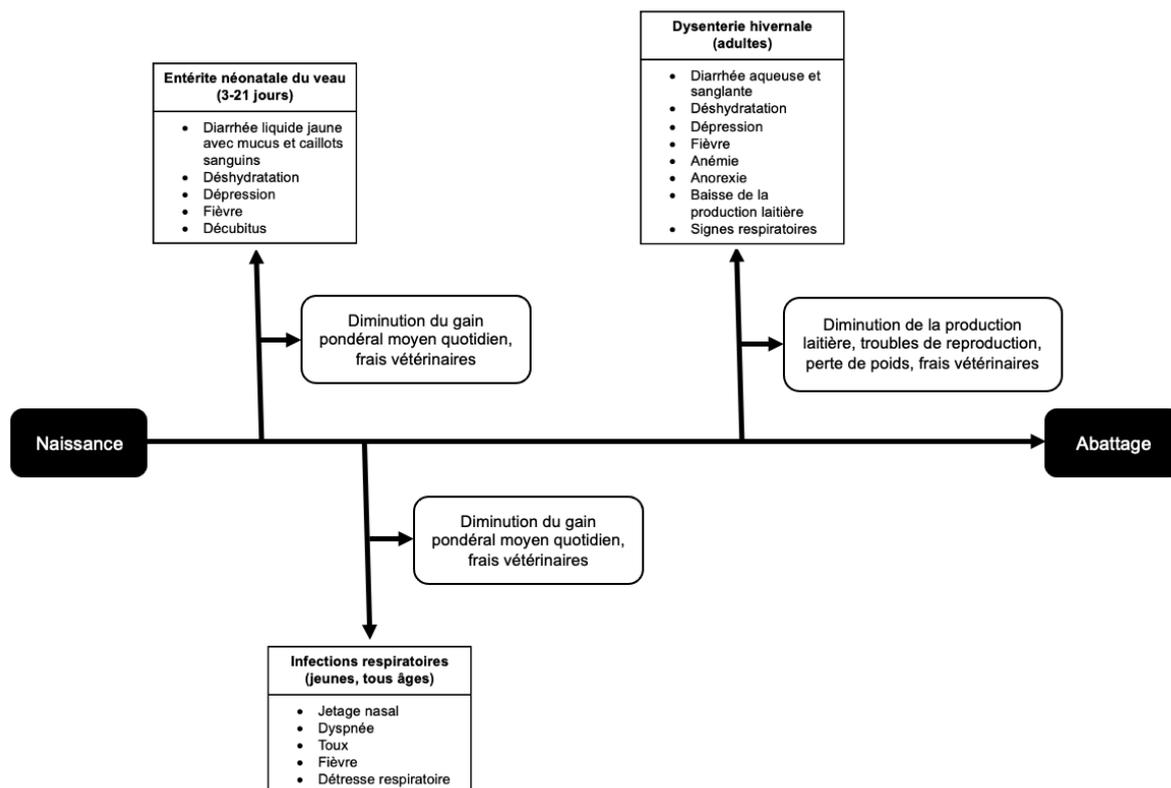


Figure 10 : Signes cliniques et impact économique des formes cliniques du BCoV chez les bovins (Hodnik, Ježek, Starič 2020).

Dans la suite de cette description, nous nous concentrerons sur les infections respiratoires principalement.

5. Épidémiologie et transmission du virus

5.1. Épidémiologie

Les BCoV sont répandus dans le monde entier d'après les données de séroprévalence des anticorps spécifiques du BCoV (Clark 1993; Saif 1990). La diarrhée et les symptômes respiratoires causés par l'infection par le BCoV ont été largement décrits d'abord en Amérique, puis en Europe et en Asie, plus récemment en Océanie, et même en Afrique (Saif 2010b; Bartels et al. 2010; Burimuah et al. 2020; Gagea et al. 2006; Kanno et al. 2007; Keha et al. 2019).

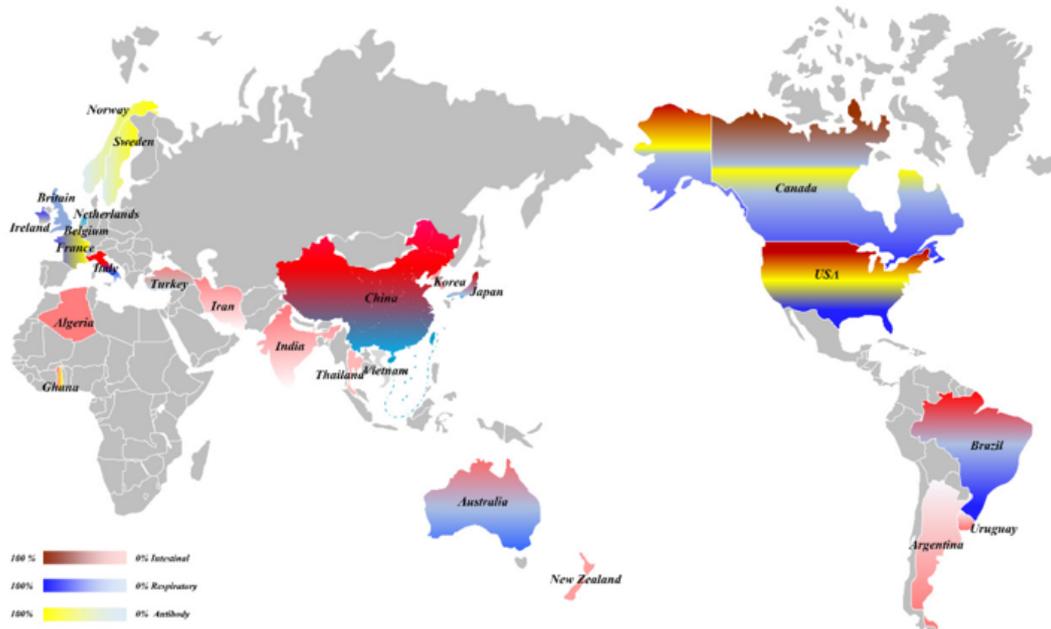


Figure 11 : Prévalence globale du BCoV (Zhu, Li, Sun 2022).

Dans un parc d'engraissement de l'Ohio, sur 85 bovins d'environ 7 mois, une étude a montré des proportions élevées d'excrétion nasale et fécale du BCoV, détecté par RT-PCR, de 84 et 96 % respectivement, dans les 21 jours suivant l'arrivée des bovins (Hasoksuz et al. 2002). Dans une autre étude, des tests ELISA sur 200 bovins 3 jours avant l'arrivée en parc d'engraissement ont démontré que l'excrétion nasale précédait systématiquement l'excrétion fécale (Thomas et al. 2006). De nombreux bovins (61-74 %) excrètent le BCoV par voie respiratoire avant d'être expédiés vers les parcs d'engraissement. Ainsi, 58 à 95% des bovins ont séroconverti vis-à-vis du BCoV trois semaines après leur arrivée en parcs d'engraissement (Martin et al. 1998; Lathrop, Wittum, Loerch, et al. 2000; Cho, Hoet, et al. 2001; Hasoksuz et al. 2002). La distribution généralisée du BCoV pourrait s'expliquer par deux facteurs principaux : (1) l'excrétion à des titres élevés du virus via les voies respiratoire et digestive (Heckert et al. 1990; Decaro et al. 2008) et (2) l'existence d'animaux porteurs asymptomatiques dans la plupart des troupeaux. Ces animaux porteurs excrètent le virus dans les sécrétions nasales et les matières fécales et constituent une source d'infection pour les nouveau-nés et les autres animaux sensibles à leur contact (Heckert et al. 1990).

Bien que le BCoV ait été détecté dans des échantillons respiratoires chez des veaux tout au long de l'année, la détection est maximale au début de l'hiver (44,1 %) et elle reste élevée jusqu'au début de l'été (9,3 %) (McNulty et al. 1984). Différentes

racés de bovins peuvent être infectées par le BCoV. L'étude de Bok et al. Montre que le taux d'infection par le BCoV des bovins laitiers était significativement plus élevé que celui des bovins allaitants, avec des taux d'infection de 5,95 % (63/1058) et 1,71 % (92/5365), respectivement (Bok et al. 2015). Plusieurs rapports ont montré que l'infection par le BCoV dans les voies respiratoires des bovins de boucherie était relativement fréquente (Zhang et al. 2019; Headley et al. 2018; Beaudeau et al. 2010; Fulton et al. 2011; Workman et al. 2019). Cet effet peut être attribué au fait que les bovins de boucherie sont davantage impliqués dans le transport; le stress lié au transport étant généralement l'une des principales causes du syndrome respiratoire bovin (Lin et al. 2001; Storz, Lin, et al. 2000).

Le BCoV est sécrété dans les matières fécales et les sécrétions respiratoires. Le BCoV respiratoire est transmis par voie féco-orale et potentiellement respiratoire, via les aérosols (Zhu, Li, Sun 2022). En effet, la fréquence d'isolement du BCoV dans les écouvillons nasaux très élevée suggère que l'infection intestinale des veaux par le BCoV peut se produire aussi bien par voie respiratoire que digestive (Saif et al. 1986).

5.2. Parenté entre les souches des différentes formes cliniques

À ce jour, tous les isolats de BCoV examinés par des techniques de neutralisation croisée, quelle que soit leur origine clinique, appartiennent à un seul sérotype (Tsunemitsu, Saif 1995; Hasoksuz, S. L. Lathrop, et al. 1999). D'après Chouljenko et al., les changements de nucléotides et d'acides aminés relatifs à la virulence sont localisés dans les gènes S et HE et dans un cadre de lecture ouvert de 32 kDa (Chouljenko et al. 1998). Malgré les différences génétiques détectées, des mutations ponctuelles, mais aucune délétion, dans le gène codant pour la glycoprotéine S ont été identifiées entre les isolats entériques et respiratoires, y compris ceux issus d'un même animal (Zhang et al. 2007; Chouljenko et al. 1998). Aucune marque antigénique ou génétique cohérente n'a été identifiée pour discriminer les BCoV des différentes formes cliniques (Zhang et al. 1994; Tsunemitsu, Saif 1995; Hasoksuz et al. 2002; Kanno et al. 2007).

Les séquences génétiques ont tendance à se regrouper en fonction de la région géographique d'isolement plutôt que de la forme clinique (Park et al. 2007; Bidokhti et al. 2013). Une plus grande différence de séquence a été observée entre les isolats

plus anciens et ceux plus récents qu'entre les isolats de différentes formes cliniques (Zhang et al. 2007; Saif 2010b). De plus, le même tableau clinique a été observé chez des veaux infectés expérimentalement par des isolats issus des trois formes cliniques du BCoV (Cho, Hoet, et al. 2001; Bidokhti et al. 2013). Ils fournissent également un certain degré d'immunité croisée, sans signes cliniques, et seule l'excrétion du virus est détectée lors de la réinfection (El-Kanawati et al. 1996; Cho, Hasoksuz, et al. 2001). Par conséquent, on suppose que les signes cliniques ne sont pas le résultat d'une infection par une souche spécifique du BCoV mais d'autres circonstances au moment de l'infection telles que le stress, la température et l'état immunitaire de l'hôte (Bidokhti et al. 2013; Suzuki et al. 2020). Ainsi, le BCoV existe en tant que quasi-espèce avec un seul sérotype, mais une variation significative, de son profil antigénique (Hasoksuz, S. Lathrop, et al. 1999), le tropisme et la virulence, parmi les isolats qui n'est pas nécessairement liée à leur origine clinique (entérique ou respiratoire) (Reynolds et al. 1985; Salem et al. 2020; Tsunemitsu, Saif 1995).

5.3. Transmission interspécifique

Au-delà de provoquer une infection dans l'espèce bovine, des coronavirus du même type ont été identifiés dans près de 20 espèces d'animaux ou d'humains, ce qui indique que le BCoV a un potentiel de transmission interspécifique (Zhu, Li, Sun 2022). Des coronavirus similaires au plan nucléotidique (> 95 % d'identité) et/ou antigénique au BCoV ont été détectés dans des échantillons respiratoires de chiens avec des signes respiratoires (Erles et al. 2003), chez l'Homme (Zhang et al. 1994); un syndrome de dysenterie hivernale semblable, associé à des variantes du coronavirus bovin, ont été décrits chez les ruminants captifs et sauvages.

L'infection expérimentale de chiens a été produite avec un BCoV d'origine entérique, provoquant une infection subclinique et une séroconversion (Kaneshima et al. 2007).

Il n'existe pas ou peu d'enquêtes de séroprévalence pour les coronavirus de type bovin chez les espèces aviaires (Ismail et al. 2001).

Un isolat de coronavirus entérique humain isolé chez un enfant souffrant de diarrhée aiguë (HECoV-4408) était génétiquement (99 % d'identité nucléotidique dans

le gène S et HE) avec le BCoV et étroitement lié au plan antigénique avec le BCoV, ce qui suggère qu'il s'agit d'un variant du BCoV capable d'infecter l'Homme (Zhang et al. 1994). Un rapport récent a confirmé que la souche humaine HECov-4408 infecte et provoque de la diarrhée et des lésions intestinales chez des veaux gnotobiotiques. Cette souche a induit une immunité de protection croisée complète contre la souche bovine entérique virulente BCoV-DB2.

Après avoir été détectés chez des ruminants domestiques (mouton, chèvre, dromadaire, lama et alpaga), des coronavirus de type bovin ont été détectés dans des échantillons fécaux provenant de ruminants sauvages tels que le cerf sambar (*Cervus unicolor*), le cobe commun (*Kobus ellipsiprymnus*), l'antilope noire (*Hippotragus niger*), le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), le bison d'Europe (*Bison bonasus*), le tahr de l'Himalaya (*Hemitragus jemlahicus*), le sitatunga (*Tragelaphus spekii*), le nyala (*Tragelaphus angasii*) et la girafe (*Giraffa camelopardalis*) (Tsunemitsu et al. 1995; Hasoksuz et al. 2007; Alekseev et al. 2008; Chung et al. 2011). Comme aucun marqueur génétique spécifique n'a été identifié pour discriminer les coronavirus de type bovin ruminant des BCoV jusqu'alors (Alekseev et al. 2008), la transmission interspécifique des BCoV peut être courante entre les espèces de ruminants domestiques et sauvages. Dans plusieurs études réalisées aux États-Unis et au Canada sur des ruminants sauvages captifs et indigènes, comme le caribou (*Rangifer tarandus caribou*) (Elazhary et al. 1981) ou de jeunes wapitis (Majhdi, Minocha, Kapil 1997), des réservoirs sauvages potentiels pour le BCoV ont été identifiés avec des coronavirus de type bovin qui sont étroitement liés au BCoV du point de vue biologique, génétique et antigénique (99%) (Tsunemitsu et al. 1995). Des isolats de coronavirus de ruminants sauvages provenant de sambars, de cerfs de Virginie et de cobes ont également infecté les voies respiratoires supérieures et le tube digestif de veaux gnotobiotiques, et provoqué de la diarrhée (Tsunemitsu et al. 1995), confirmant expérimentalement que les ruminants sauvages peuvent servir de réservoir pour les souches de coronavirus transmissibles au veau. En Corée, des écouvillons nasaux de cerfs d'eau (*Hydropotes inermis*) sauvages non captifs, reconnus comme la faune sauvage la plus commune côtoyant les fermes bovines, ont permis d'identifier des coronavirus présents dans les voies respiratoires dont les séquences génomiques complètes étaient étroitement reliées au BCoV (> 98 %) (Kim et al. 2018).

Toutes ces données suggèrent que les ruminants sauvages qui partagent des zones de pâturage communes avec les bovins pourraient être un réservoir de coronavirus transmissibles aux bovins, ou vice versa.

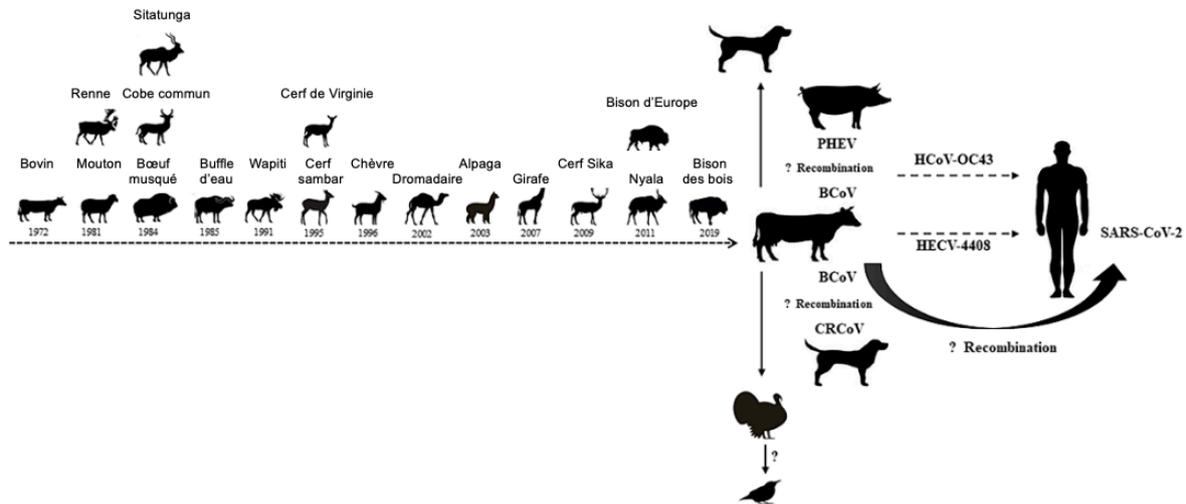


Figure 12 : Transmission interspécifique potentielle du BCoV (Zhu, Li, Sun 2022).

6. Pathogénie respiratoire

Bien que le rôle et la pathogénie du BCoV dans la diarrhée des veaux soient parfaitement établis, son rôle dans le complexe respiratoire bovin est encore controversé.

6.1. Rôle pathogène

Actuellement, peu de preuves physiques de la présence du BCoV dans les tissus respiratoires sont disponibles. Lors de l'analyse post-mortem, les tissus présentent souvent peu de signes physiques d'infection virale, simplement parce que les virus respiratoires responsables d'infection aiguë se sont multipliés, puis ont disparu au moment où l'animal succombe à des infections bactériennes secondaires, plus facilement démontrables (Booker et al. 2008; Saif 2010b). En effet, les seules preuves qui incriminent le BCoV en tant qu'agent pathogène respiratoire existent sous la forme de données épidémiologiques et de sa détection lors de la réaction d'analyses de diagnostic de routine. Le BCoV a été détecté dans des échantillons respiratoires provenant aussi bien de bovins sains (Hasoksuz, S. L. Lathrop, et al. 1999; Storz,

Purdy, et al. 2000) qu'atteints de MRB (Hasoksuz, S. L. Lathrop, et al. 1999; Fulton et al. 2009; O'Neill et al. 2014; Fulton et al. 2016; Doyle et al. 2017). Dans ce dernier cas, l'excrétion du BCoV a été documentée en l'absence d'autres agents pathogènes respiratoires identifiés (Storz, Purdy, et al. 2000) et, plus fréquemment, en tant qu'agent de co-infection avec d'autres agents pathogènes respiratoires dans des échantillons prélevés sur des cas cliniques (Fulton et al. 2009; 2016; Storz, Purdy, et al. 2000; Storz, Lin, et al. 2000; Gagea et al. 2006; Cho, Hoet, et al. 2001). Même si elle n'est pas cohérente avec les postulats d'Evan (Storz, Lin, et al. 2000), la présence de BCoV dans les sécrétions nasales de bovins sains n'est pas disculpatoire de la pathogénicité ; cependant, cela rend son rôle en tant qu'agent pathogène respiratoire majeur, basée sur sa seule détection, plus difficile.

En 1982, Thomas et al. ont décrit l'isolement de BCoV dans les voies respiratoires inférieures de veaux avec des signes respiratoires, et l'infection expérimentale de jeunes veaux avec ces isolats par voie respiratoire (Thomas et al. 1982). Néanmoins, la pathogénie du BCoV dans les maladies respiratoires n'était pas clairement définie. De nouveaux progrès ont été réalisés en 1984, lorsque McNulty et al. ont isolé le BCoV du poumon d'un veau avec une bronchopneumonie (McNulty et al. 1984). L'inoculation intranasale et intratrachéale avec du BCoV a produit une maladie clinique bénigne avec une infection des voies respiratoires supérieures, associée à des symptômes respiratoires légers dont de la toux et des écoulements nasaux. La contribution du coronavirus aux lésions pulmonaires d'atélectasie observées dans les deux cas de terrain est difficile à définir car, dans les deux cas, d'autres pathogènes respiratoires ont également été isolés de leurs poumons. Les sites de prédilection pour la multiplication du BCoV sont plutôt l'intestin grêle distal, le gros intestin et l'épithélium des cavités nasales et de la trachée (Reynolds et al. 1985).

Concernant les tentatives de démontrer le postulat de Koch en reproduisant expérimentalement la maladie, les preuves convaincantes impliquant le BCoV dans une relation causale avec une maladie respiratoire sont rares. En effet, plusieurs études ont échoué à produire des signes respiratoires en inoculant expérimentalement des veaux avec divers inoculums de BCoV (Reynolds 1983; Saif et al. 1986; Heckert, Saif, Myers 1989). En effet, dans ces études, aucun signe clinique respiratoire n'a été observé sur la totalité des veaux inoculés, même chez ceux pour lesquels le BCoV a été détecté dans les écouvillons nasaux. Une autre étude, publiée sous la forme de 2

brèves communications, a rapporté la reproduction d'un faible niveau d'atteinte respiratoire (Kapil, Trent, Goyal 1990; Kapil et al. 1991) ; encore une fois sans prouver l'absence d'autres pathogènes respiratoires au même moment. Seuls quatre des postulats de Koch associant le BCoV à une maladie des voies respiratoires supérieures et inférieures ont été vérifiés.

En 1991, au Japon, Tsunemitsu et al. ont isolé le BCoV à partir d'écouvillons nasaux de veaux nouveau-nés sans signe clinique ou qui présentaient de la diarrhée (Tsunemitsu et al. 1991). Cela indique que le virus a un tropisme pour l'appareil respiratoire supérieur aussi bien que pour le tractus intestinal. Cela confirme également que les cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur sont hautement réceptives à l'infection par le BCoV comme le suggéraient les précédents rapports (McNulty et al. 1984; Reynolds et al. 1985; Saif et al. 1986; Heckert, Saif, Myers 1989). En 1996, des chercheurs ont isolé le BCoV chez des bovins impliqués dans des épisodes de maladies respiratoires dans des parcs d'engraissement au Kansas et dans l'Arizona (Storz et al. 1996).

Quelques années plus tard, Storz et al. ont montré une avancée dans l'étude de la pathogénie des MRB sur des cas spontanés, en lien avec une infection respiratoire par le BCoV à l'arrivée en parc d'engraissement ; ces cas présentaient des infections doubles par le BCoV et des bactéries respiratoires (*Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*) (Storz, Lin, et al. 2000). Cette progression a entraîné une pneumonie et la mort chez 26 cas, dont la plupart avaient des titres élevés à la fois de BCoV et des bactéries dans les poumons. Les chercheurs ont alors conclu que ces données étayaient la contribution du BCoV au développement des MRB, tel que défini par les critères de causalité d'Evans. Dans cette étude (Storz, Lin, et al. 2000) et une autre supplémentaire (Storz, Purdy, et al. 2000), les chercheurs ont confirmé la présence de l'antigène BCoV dans les cellules épithéliales respiratoires, ou ont isolé le BCoV à partir des sécrétions nasales, de la trachée, des bronches ou des alvéoles pulmonaires. Ils ont documenté la présence d'emphysème interstitiel, de bronchiolite et d'alvéolite, de concert avec une infection bactérienne. Dans le contexte où les MRB sont reconnues comme une maladie multifactorielle, ces preuves soutiennent le rôle du BCoV dans l'incitation à la maladie.

Dans une étude menée par Lathrop et al. sur des bovins vaccinés contre les autres valences virales respiratoires (BRSV, BVDV, BHV-1 et BPI-3V), il a été montré que les bovins excrétaient le BCoV par voie nasale et développant ultérieurement une réponse anticorps contre le virus, étaient plus susceptibles de requérir un traitement pour des troubles respiratoires et plus susceptibles d'avoir des lésions pulmonaires à l'abattoir que les bovins qui n'excrétaient pas le virus ou ne développaient pas de réponse anticorps contre le BCoV (Lathrop, Wittum, Brock, et al. 2000).

Dans un autre rapport, l'excrétion nasale de BCoV ou un titre d'anticorps inférieur à 20 étaient corrélés à un risque accru de traitement pour une MRB, tandis que la vaccination intranasale avec le vaccin BCoV atténuait ce risque (Plummer et al. 2004). Des études de séroprévalence du BCoV portant sur 135 troupeaux laitiers norvégiens ont démontré que les veaux des troupeaux séropositifs au BCoV présentaient un risque accru de développer une maladie respiratoire par rapport aux troupeaux séronégatifs au BCoV (Gulliksen et al. 2009). Plus récemment, une enquête sur des épidémies de maladies respiratoires aiguës chez des veaux de boucherie en élevage intensif a montré une série de lésions macroscopiques et histologiques qui pourraient être compatibles avec une infection par le BCoV (Hick et al. 2012). L'ARN du BCoV a été détecté par RT-qPCR, mais le lien avec les lésions histologiques n'a pas été étudié.

L'ensemble de ces données soutient que le BCoV a une certaine importance en tant qu'agent pathogène respiratoire primaire. Certes, les preuves disponibles indiquent qu'il n'est pas associé à une infection du parenchyme pulmonaire, ni à une pneumonie marquée ou sévère ; mais plutôt une infection de l'épithélium trachéal et nasal associée à des signes cliniques bénins (Ellis 2019; Ellis et al. 2020). Certainement, l'infection et l'inflammation, relativement bénigne en elle-même, pourraient servir et sert probablement de préambule à une ou plusieurs infections secondaires (Straub 1995). Fahkrajang et al. ont montré que l'infection par le BCoV augmente l'adhérence de bactéries comme *Pasteurella multocida* aux cellules des voies respiratoires supérieures et pulmonaires en raison de l'augmentation de l'expression de deux molécules d'adhérence bactériennes d'importance (Fahkrajang et al. 2021) : la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et le récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAF-R).

Ainsi, une maladie sous-jacente, une ou plusieurs co-infections respiratoires, la dose et la voie d'infection (orale ou respiratoire), l'immunodépression (corticostéroïdes) liée au transport ou aux co-infections virales à propriétés immunosuppressives, sont des cofacteurs potentiels qui pourraient aggraver la gravité des infections à BCoV (Saif 2010b). En effet, la difficulté à reproduire la maladie avec une monoculture de BCoV (ou d'autres agents pathogènes respiratoires reconnus), prouve que les postulats de Koch sont un moyen limité d'envisager une maladie syndromique, multifactorielle et étiologiquement compliquée. Le BCoV semble être un agent infectieux précoce lors d'infection respiratoire (Fulton et al. 2011). Il est donc probable que le BCoV agit en synergie avec des agents bactériens, en présence de facteurs environnementaux et de stress favorisant pour permettre la colonisation bactérienne secondaire des poumons, à l'origine d'une pneumonie (Park et al. 2007).

Il a également été démontré que, dans certains cas, le BCoV peut provoquer des infections subcliniques chroniques qui pourraient être une source persistante d'excrétion virale ; celles-ci peuvent contribuer à la réapparition de la maladie dans le même groupe de bovins (Crouch et al. 1985; Kapil, Trent, Goyal 1990; Clark 1993; Oma et al. 2016).

6.2. Lésions

Dans l'étude de (Kapil, Basaraba 1997), lors d'une infection expérimentale avec un isolat pneumo-entérique de BCoV à des veaux nouveau-nés privés de colostrum, les lésions macroscopiques observées sont : une congestion, une hémorragie et un œdème des cloisons interlobulaires. Les zones ventrolatérales des poumons sont celles principalement impliquées.

À l'échelle microscopique, les mêmes veaux développent une pneumonie interstitielle avec une congestion et des hémorragies alvéolaires. Une caractéristique histologique importante du BCoV est l'épaississement des cloisons alvéolaires par infiltration de cellules inflammatoires mononucléées dans les zones interstitielles des poumons.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Présentation générale du projet expérimental

1. Contexte, enjeux et positionnement du projet par rapport à l'état de l'art

Comme développé dans la partie introductive, les maladies respiratoires sont des troubles de la santé qui ont une importance majeure dans tous les systèmes d'élevage de bovins en stabulation. Ils compromettent la rentabilité et la durabilité de ce secteur, partout dans le monde.

Malgré le développement de nouveaux vaccins, de nouvelles options thérapeutiques et des efforts importants pour améliorer les conditions d'élevage, les taux de morbidité et de mortalité de ces maladies restent élevés. Les maladies respiratoires sont aussi une atteinte au bien-être animal, qui est devenu une préoccupation sociétale forte. Le bien-être de l'éleveur, du fait de la charge mentale, de l'inquiétude et de la charge de travail élevées lorsque ses animaux sont malades sont aussi à mieux prendre en compte. Le traitement des maladies respiratoires est une des principales causes d'utilisation des antibiotiques, notamment dans les ateliers d'engraissement de jeunes bovins (Fulton 2009). Le nombre élevé de bovins malades ou morts de maladies respiratoires crée des pertes à l'échelle de la production et contribue à la mauvaise gestion des ressources alimentaires ; il contribue en outre à l'impact environnemental de l'élevage bovin. Ainsi, les enjeux associés à une meilleure maîtrise des maladies respiratoires sont l'amélioration de la santé du cheptel bovin pour réduire les pertes directes et indirectes, contribuant ainsi à une meilleure gestion des ressources alimentaires, une réduction de l'impact environnemental de l'élevage, et une moindre consommation d'antibiotiques donc un risque réduit d'émergence de bactéries résistantes, ainsi qu'une amélioration du bien-être animal et de celui des éleveurs. Tous ces enjeux s'inscrivent parfaitement dans le concept « *One Welfare*,

One Health », une seule santé et un seul bien-être, animal, environnemental et humain.

Les maladies respiratoires sont d'origine multifactorielle, causées par divers agents pathogènes qui agissent souvent en association, voire en synergie, avec souvent l'intervention primaire de virus et des surinfections bactériennes qui apparaissent dans leur sillage. Parmi les virus pathogènes respiratoires des bovins, le coronavirus bovin (BCoV) retient particulièrement l'attention des chercheurs en raison du contexte sanitaire actuel chez l'Homme, et la pandémie de COVID-19. La transmission virale par voie aérienne via les bioaérosols a rarement été prouvée de manière expérimentale (Mars, Brusckhe, van Oirschot 1999).

Un verrou technologique important pour la détection directe des agents pathogènes dans l'air lors d'infection respiratoire est la difficulté à capturer et à concentrer les agents en suspension dans l'air, ce qui n'était jusque-là possible qu'avec des techniques lourdes inapplicables dans le contexte du diagnostic médical. Pour le prélèvement, les animaux malades doivent être fermement contenus ce qui accroît leur stress et aggrave l'insuffisance respiratoire lorsqu'elle est présente. Les prélèvements effectués dans le tractus respiratoire sont invasifs *a minima* gênants (écouvillonnage nasal) voire douloureux (lavage broncho-alvéolaire) requérant une anesthésie préalable pour immobiliser l'animal. Les méthodes sont en outre très chronophages pour le manipulateur et le vétérinaire. Les échantillons doivent ensuite être acheminés vers un laboratoire pour y être analysés, faisant appel à des méthodes et des instruments sophistiqués. Les résultats ne sont pas disponibles le plus souvent avant plusieurs jours, et avant ce délai, ils ne peuvent pas être pris en compte dans les choix thérapeutiques.

Lever ce verrou suppose donc de développer des techniques de détection et d'identification des agents pathogènes présent dans l'air expiré (prélèvement non-invasif, contention minimale) avec une obtention rapide des résultats (quelques minutes) et quasiment au pied de l'animal en élevage. C'est pourquoi, le plus souvent, la recherche des agents impliqués est limitée aux cas graves ou récidivants.

Dans ce contexte, plusieurs méthodes de collecte virale dans l'air ont été décrites en médecine humaine (Breshears et al. 2022). À notre connaissance aucune

méthode de prélèvement d'air expiré n'est utilisée à l'heure actuelle en routine dans le cadre du diagnostic étiologique des maladies respiratoires chez les bovins. Pour la plupart des techniques, à l'exception de la précipitation électrostatique, des forces de cisaillement élevées sont exercées lors du prélèvement et elles altèrent de façon plus ou moins importante la viabilité des particules virales. Pour certaines, la collecte est réalisée sur un milieu solide ; une phase de transfert en milieu liquide est donc indispensable pour une détection par les méthodes conventionnelles. Par ailleurs, la détection en temps quasi-réel d'agents infectieux dans l'air est difficile, car elle est compliquée par plusieurs facteurs (Fronczek, Yoon 2015). En premier lieu, l'obstacle majeur peut-être la concentration extrêmement faible des agents pathogènes présents dans les aérosols, en lien avec la sensibilité des techniques et la performance de collecte des dispositifs. La présence de particules de poussière, diverses et hétérogènes par nature, peut interférer avec les méthodes de collecte et de détection des aérosols, et leur gestion représente également un défi majeur.

Très peu de recherches ont réussi à coupler les méthodes de détection aux prototypes de collecte d'aérosol en les intégrant dans un dispositif complet, autonome et portable. La méthodologie repose sur la mise en œuvre d'un biocollecteur (Borges et al. 2021) puis l'analyse des échantillons par amplification biomoléculaire, par séquençage, par des tests immunologiques, ou par culture. Parmi ces techniques, l'analyse par amplification biomoléculaire est la plus sensible, et les nombreux développements réalisés l'ont rendu facilement automatisable, robuste et rapide. Concernant la détection en santé humaine, Biomérieux propose l'instrument Biofire qui met en œuvre une cartouche microfluidique intégrant toutes les étapes de préparation et d'analyse d'un échantillon par qPCR. Diagcore commercialise également un instrument et des cartouches microfluidiques intégrant toutes les étapes de préparation et d'analyse d'un échantillon par qPCR. Les analyses pourraient être accélérées par la mise en œuvre de techniques d'amplification isotherme (LAMP) qui ne sont pas quantitatives mais permettent d'identifier la présence d'un pathogène de façon spécifique en une vingtaine de minutes.

Dans ce contexte, le projet AIDAV (Approches Innovantes pour la Détection des Agents Viraux respiratoires chez les bovins) a vu le jour. La ligne directrice du projet est la mise au point d'une méthode de prélèvement non invasive respectant le bien-être animal et prenant en compte la praticité d'utilisation pour l'utilisateur ; couplée à

une technique d'identification portable et rapide dans les élevages, sur les animaux malades/infectés, qui soit sensible et ciblée sur les agents viraux dominants.

La solution proposée est une technologie de rupture adoptable par divers acteurs en production animale, et susceptible de modifier la prévention des maladies respiratoires en facilitant le diagnostic et une prise en charge rapide. Elle sera utilisable sur un animal isolé ou un groupe (au même titre que les techniques de prélèvement existantes) et sera multiplexable pour rechercher plusieurs virus simultanément.

2. Objectifs du projet et verrous techniques

L'objectif du projet est de mettre au point et d'évaluer une approche non invasive fondée sur l'analyse de l'air expiré par les animaux en remplacement des prélèvements invasifs tels que ceux décrits dans la partie introductive. Mais cette approche peut se heurter à plusieurs difficultés lorsque ces agents sont des virus. En effet les biocollecteurs commerciaux sont tous des instruments développés pour la collecte de bactéries ou de spores fongiques dont la taille est supérieure à $1\mu\text{m}$. Leur efficacité pour la collecte de virus est globalement faible pour des agents susceptibles d'être présents dans la fraction submicronique des aérosols. Dans ce contexte le laboratoire LSMB du CEA-Leti propose l'évaluation de la précipitation électrostatique développée spécialement pour une collecte efficace de toutes les particules en suspension d'une taille comprise entre 10 nm et $10\mu\text{m}$. Les biocollecteurs développés au LSMB sur ce principe physique ont, en outre, l'avantage d'être silencieux et ainsi de ne pas perturber les animaux soumis au prélèvement dans les élevages.

Un objectif plus ambitieux est de permettre une analyse directe, en 20 minutes environ et sans autre manipulation, des échantillons prélevés (**Figure 13**). Cette ambition peut être atteinte au moyen de cartes microfluidiques dédiées, contenant tous les réactifs nécessaires à l'intérieur d'un dispositif compact. Pour ce faire, le CEA-Leti adaptera un instrument de collecte et d'analyse automatisée, dont le développement a débuté dans le cadre de la pandémie actuelle de Covid-19, et qui permettra la détection du BCoV qui est un coronavirus proche de l'agent de la Covid. Parmi les agents viraux responsables de MRB, nous privilégions le coronavirus bovin dont la

prévalence est élevée alors que les connaissances épidémiologiques et les outils de maîtrise sont moins bons que pour les autres virus.

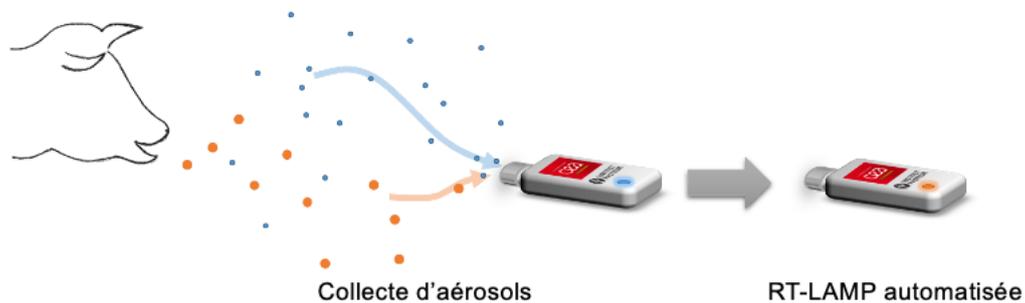


Figure 13 : Description schématique de la solution proposée.

Le développement de telles techniques d'identification des agents pathogènes pour les maladies respiratoires des bovins permettrait :

(i) de démocratiser l'identification des agents pathogènes responsables des maladies respiratoires par les vétérinaires pour adapter les plans de prévention et de traitement.

(ii) d'envisager une utilisation, selon la situation et la question posée, individuelle ou collective de ces techniques : le prélèvement pourrait être réalisé soit sur l'individu malade, soit dans l'air environnant un groupe d'animaux ayant développé des troubles ou dont on veut connaître le statut infectieux.

(iii) d'augmenter le pool de données disponibles pour mieux comprendre l'étiologie des maladies respiratoires, les dynamiques de transmission des agents pathogènes (pour les acteurs de la recherche et du développement) et de proposer des outils de gestion intégrée de la santé en élevage.

(iv) d'accélérer le développement de ces approches non invasives à d'autres contextes épidémiologiques (pathogènes, espèces d'élevage).

3. Acteurs du projet

Le projet repose sur les compétences complémentaires du CEA-Leti représenté par le Laboratoire de Systèmes Microfluidiques et de Biotechnologies (LSMB) de Grenoble et des équipes France Futur Élevages (F2E) qui regroupent :

- Deux unités de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAe) : l'unité IHAP (Interactions Hôtes-Agents Pathogènes) concernant la recherche en infectiologie animale basée à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) ;
- L'unité BIOEPAR (Biologie, Épidémiologie et Analyse de Risque en santé animale) en collaboration avec l'École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation de Nantes-Atlantique (Oniris), qui sera chargée d'évaluer le dispositif dans les conditions d'élevage ;
- Et l'Institut de l'élevage (Idele) grâce à son service « Santé et Bien-être des Ruminants », comme partenaire du projet.

Par leur connaissance des enjeux en lien avec l'élevage, des systèmes de production de jeunes bovins (Idele, IHAP, BIOEPAR), et de la médecine vétérinaire (ENVT, Oniris), les équipes F2E ont identifié le besoin de développer des moyens fiables, non invasifs, faciles à mettre en œuvre et peu coûteux, au service d'une meilleure connaissance de l'étiologie des maladies respiratoires des jeunes bovins, pour une meilleure prise en charge de ces maladies dans les élevages. Dans ce contexte, le CEA apportera au projet les technologies de prélèvement et d'analyse de terrain développées par le LSMB. La technologie de collecte électrostatique sur laquelle le laboratoire travaille depuis une quinzaine d'années semble parfaitement adaptée à la collecte des virus respiratoires dans l'air expiré des animaux. Le laboratoire adaptera pour les besoins du projet la tête de prélèvement de ses collecteurs de façon à cibler spécifiquement les aérosols émis par un animal, sans contention de celui-ci. En complément, la veine aéraulique des collecteurs, initialement conçus pour le prélèvement environnemental, pourrait être modifiée. Le laboratoire apportera également au projet une technologie nouvelle qui permet l'enchaînement automatique d'un prélèvement et d'une analyse des échantillons, en adaptant les réactifs aux maladies respiratoires de jeunes bovins, et l'interface aux besoins des vétérinaires.

Les compétences des équipes F2E permettront d'élaborer un protocole de validation des moyens de prélèvements/analyses proposés par le CEA en conditions expérimentales (IHAP) et en fermes commerciales (Oniris/Idele) en se fondant sur les techniques d'analyse de routine (écouvillons nasaux profonds + RT-PCR ; IHAP, BIOEPAR).

II. Matériels et méthodes

1. Accord du comité d'éthique

Le protocole d'expérimentation a été approuvé par le comité d'éthique en expérimentation animale, sous le numéro #2022053116436690 v5.

L'accord du comité éthique prévoit la conception et l'application des procédures expérimentales aux animaux, les soins aux animaux et la procédure de mise à mort des animaux dans le respect de la charte de l'utilisation éthique des animaux à des fins expérimentales.

2. Plan de travail du projet et détail des phases expérimentales

2.1. Plan de travail global

Le projet AIDAV a vu le jour en octobre 2021 et a été construit pour s'articuler sur 30 mois.

Dans un premier temps, l'effort est porté sur la mise au point des moyens de prélèvement non invasifs par le CEA selon les recommandations des équipes F2E en termes de conditions de prélèvement sur le terrain, notamment la qualité de l'air ambiant et la robustesse du matériel. Ainsi, le CEA a réalisé deux dispositifs de prélèvement électrostatique et développé un cône de prélèvement qui permet de canaliser les aérosols émis par les jeunes bovins. Le cône de prélèvement doit permettre de recueillir les bioaérosols produits par un animal particulier sans la contention qu'imposerait la mise en place d'un masque. En parallèle, le laboratoire LSMB du CEA a développé des réactifs LAMP nécessaires à la détection du virus respiratoire sélectionné par les équipes F2E, le BCoV, sur la base de connaissances antérieures (publications, données non publiées). À ce stade les réactifs sont développés pour être employés directement sous forme liquide, sans considération pour l'embarquement de ceux-ci dans la balise finale.

Une fois l'étape de conception préliminaire terminée, pour évaluer la méthode de prélèvement en vue de sa validation, les équipes F2E ont mis en œuvre une première phase expérimentale dans une unité de l'IHAP pour tester les moyens techniques développés par le laboratoire LSMB du CEA-Leti et intercomparer les résultats avec ceux obtenus par des techniques non invasives commerciale et une technique invasive de référence (un ENP pour une détection par RT-qPCR).

Une fois la preuve de concept établie, grâce à l'expérience acquise durant la première phase expérimentale, une étape d'adaptation de la balise autonome développée au CEA par le laboratoire LSMB a permis d'adapter la tête de prélèvement de l'instrument et son boîtier aux conditions expérimentales notamment pour le couplage avec le cône de prélèvement et l'amélioration de la collecte. En complément le laboratoire LSMB a travaillé au conditionnement des réactifs nécessaires à la détection du virus dans la balise. De façon à être stabilisés et d'une forme qui facilite leur embarquement dans les consommables, ceux-ci sont lyophilisés dans des moules développés sur-mesure. Cette étape est critique pour disposer de réactifs prêts à l'emploi sans conditions de conservation trop limitantes et pour faciliter leur intégration dans le protocole d'analyse.

Enfin, la dernière phase en conditions expérimentales consiste à évaluer avec la balise optimisée, le prélèvement du BCoV dans l'air. Pendant le même temps, les prélèvements servent à évaluer la méthode de détection virale par amplification moléculaire (LAMP).

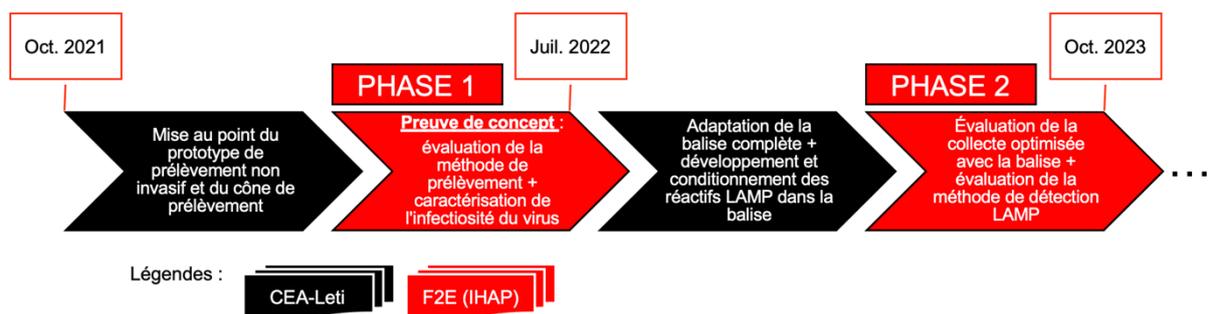


Figure 14 : Frise chronologique synthétisant les étapes clés du projet AIDAV.

2.2. Phase expérimentale 1 : preuve de concept

La première phase expérimentale en juillet 2022 consiste à évaluer la méthode de prélèvement mise au point par le CEA en vue de sa validation pour être intégrée dans la balise complète.

Pour cela, trois veaux ont été préalablement recrutés et infectés expérimentalement avec le BCoV selon le modèle décrit dans les étapes préliminaires. L'objectif est de réaliser des prélèvements non invasifs des voies respiratoires avec plusieurs biocollecteurs, dont deux sont commerciaux, en plus de celui à évaluer. En parallèle, un suivi clinique des animaux a été mis en place, ainsi que des prélèvements invasifs de référence par écouvillonnage nasal profond.

Tous les échantillons d'air et nasaux prélevés ont été traités et analysés en RT-qPCR pour évaluer la capacité de collecte du biocollecteur d'intérêt par rapport aux autres biocollecteurs déjà développés et à la méthode de référence.

Les prélèvements ont été réalisés pendant 8 jours après l'infection expérimentale par le BCoV afin de décrire la cinétique d'infection par le virus. À la fin des 10 jours de suivi, les veaux ont été euthanasiés et une autopsie a été réalisée.

2.3. Phase expérimentale 2 : validation de la balise complète

Cette phase expérimentale a eu lieu en octobre 2023 et consiste à évaluer la balise complète, en dissociant encore les étapes de collecte et de détection, en vue de la déployer ultérieurement en élevage.

De la même façon, trois autres veaux ont été préalablement recrutés et infectés expérimentalement avec le même isolat de BCoV selon le modèle décrit dans les étapes préliminaires et validé par la première phase expérimentale. L'objectif reste le même, c'est-à-dire de réaliser des prélèvements non invasifs des voies respiratoires avec les mêmes biocollecteurs, les deux commerciaux et la version optimisée de celui à tester. En parallèle, un suivi clinique et des prélèvements pour l'évaluation de l'infection par la méthode de référence après écouvillonnage nasal profond sont réalisés sur le même principe qu'en juillet 2022.

Tous les échantillons d'air et nasaux prélevés ont été traités et analysés en RT-qPCR pour (i) confirmer les résultats de la phase expérimentale 1 et (ii) servir de méthode de référence pour évaluer une méthode de détection par RT-LAMP développée pour le module Arise. Tous les échantillons de cette série sont donc analysés en RT-LAMP également.

Par rapport à la phase 1, le but est de se concentrer sur une détection virale plus précoce ; c'est pourquoi les prélèvements sont réalisés uniquement les 4 premiers jours qui suivent l'inoculation. À la fin des 4 jours de suivi, les veaux ont été euthanasiés et une autopsie a été réalisée.

La suite du travail traite des deux phases expérimentales du projet AIDAV présentées précédemment.

3. Étapes préliminaires à l'expérimentation

3.1. Recrutement des animaux

Le modèle infectieux choisi pour tester l'outil de détection étant le BCoV, en raison de sa pathogénie, les animaux ciblés par l'expérimentation sont des jeunes bovins.

Les bovins recrutés sont des veaux de race Prim'Holstein et Red'Holstein. Ce sont des mâles car la fourniture est possible à moindre coût, les femelles étant conservées dans l'élevage pour le renouvellement. Il n'y a pas de différence physiologique susceptible d'altérer l'interprétation des résultats et la conclusion de l'étude en lien avec le sexe de l'animal. Ils proviennent de l'élevage du Domaine de Lamothe de l'école d'ingénieur de Purpan (EIP) à Toulouse. Ils sont âgés d'au plus un mois au début des expérimentations afin d'avoir des animaux de poids compatibles avec une manipulation aisée et suffisamment âgés pour que le risque d'entérite néonatale soit écarté.

Les veaux sélectionnés ont tous reçu une administration standardisée de colostrum, testé et dépourvu d'anticorps vis à vis du BCoV, d'un volume de 4 L par sondage oro-gastrique, dans les premières heures qui suivent la naissance, afin d'écartier la variabilité d'origine immunitaire. Ils sont en bonne santé, c'est-à-dire qu'ils ne présentent pas d'affection concomitante ; en particulier, sont surveillés les manifestations cliniques d'affection ombilicale ou d'entérite néonatale. Une sérologie pour le BCoV est réalisée sur les veaux avant leur recrutement et doit être idéalement négative pour inclure les animaux dans l'étude.

Les veaux portent des numéros d'identification nationaux conventionnels. Pour la suite de l'étude, les derniers chiffres du numéro de travail seront utilisés pour les identifier.

3.2. Hébergement et alimentation des animaux pendant l'étude

Les jeunes bovins sont logés dans des locaux en station expérimentale de niveau 3 de biosécurité, dans la partie réservée aux grands animaux (unité IHAP, site de l'ENVT). La pièce est un espace ouvert d'une superficie de 67 m² et d'un volume total de 167,5 m³. L'air est renouvelé à 20 volumes/h avec une vitesse du flux d'air de 6 à 7m/s. Pour entrer dans les locaux, le passage dans un sas de biosécurité est obligatoire, au cours duquel le personnel s'équipe d'équipements de protection individuelle comprenant une charlotte, un masque, deux paires de gants en nitrile et une combinaison intégrale avec des sur-chaussures et une capuche incluses.

Les veaux évoluent dans une case d'exercice à l'intérieur de la pièce. C'est une case sur caillebotis métallique entourée de barrières métalliques, dont la superficie est de 15 m². Dans cette case, se trouve une aire de couchage avec un tapis en caoutchouc, deux abreuvoirs automatiques et une mangeoire pour le foin.

Ils sont alimentés par buvée de lait. Il s'agit de lait reconstitué à partir de d'un aliment d'allaitement complet en poudre de formulation commerciale (Solvor Maxima) dilué dans de l'eau potable et préparé selon les instructions du fabricant à la concentration de 125 g de poudre/L d'eau. Il est distribué en deux repas par jour, matin et soir, à heures fixes dans des seaux avec des tétines, à raison de 3L par veau et par repas. Les animaux disposent d'eau et de foin à volonté.



Figure 15 : Case d'exercice des veaux. Crédit photo : photos originales.

La case est nettoyée quotidiennement pour retirer les fèces et laver l'urine qui s'écoule sous le caillebotis. Les aires où sont manipulés les veaux lors des prélèvements liés à l'expérimentation (rampe d'accès au caillebotis, sol de la salle et tapis de la niche) sont également nettoyés quotidiennement.

Les veaux ne quittent pas les locaux de la station expérimentale durant toute l'expérimentation. Pour les faire circuler dans l'animalerie, hors de leur aire de vie, une passerelle métallique est présente. Tous les examens cliniques, prélèvements et manipulations diverses sur les veaux ont lieu dans l'animalerie dans des conditions particulières de prélèvement décrites plus loin.

3.3. Protocole d'infection expérimentale des animaux avec le BCoV

Le modèle infectieux choisi pour évaluer les méthodes de collecte et de détection virale est le BCoV pour plusieurs raisons, détaillées dans la partie bibliographique introductive.

Pour notre étude, il a été choisi de réaliser une inoculation par voie intranasale sur le même principe que la vaccination par cette voie. Pour cela, un isolat de BCoV provenant d'une souche isolée en 2014 sur le terrain lors d'une épidémie respiratoire dans le Sud-Ouest de la France. La souche (BCoV/France/ICSA17-LBA/2014) a été isolée à partir d'un prélèvement de LBA et produite sur des cellules de tumeur rectale humaine (hRT-18g) (Salem et al. 2020). Pour obtenir une infection certaine, le titre de l'inoculum est de 2×10^6 TCID₅₀/mL. Ce dernier a été dilué à de moitié dans du PBS et administré à raison d'1 mL dans chacune des deux cavités nasales des veaux. L'inoculum a été vaporisé à l'aide d'une seringue de 2,5 mL et d'une canule d'application intranasale destinée théoriquement à l'administration des vaccins de la gamme Rispoval® RS+Pi3 (Zoetis) par voie intranasale. Chaque veau a donc reçu 2×10^6 TCID₅₀ de virus au total, soit 10^6 TCID₅₀ de virus dans chaque cavité nasale.

4. Suivi clinique et paraclinique journalier

Pendant toute la durée des manipulations, les veaux sont observés cliniquement à distance en surveillant particulièrement des éventuels signes cliniques d'atteinte respiratoire. On surveille la fréquence respiratoire, l'apparition de toux, de jetage nasal ou d'écoulement oculaire. Individuellement, les veaux sont examinés cliniquement de façon rapprochée. Un relevé de température rectale est effectué.

Un écouvillon nasal profond est prélevé à l'aide d'un écouvillon stérile FLOQSwabs® (Copan) muni d'une cytobrosse pour chacun des veaux, une fois par jour. La cytobrosse est préférable à l'embout en coton pour récupérer davantage de cellules respiratoires (Joulié, Herman 2023). L'écouvillon est introduit profondément dans le méat ventral d'une des cavités nasales, à 15 cm de profondeur approximativement, et frotté vigoureusement contre la muqueuse nasale en effectuant des mouvements de rotation.

5. Collecte des particules en suspension dans l'air

5.1. Conditions de prélèvement

Durant la phase expérimentale, chaque jour deux types de prélèvement sont réalisés : des prélèvements d'ambiance de la salle et des prélèvements individuels. Pour tous les prélèvements, les différents biocollecteurs fonctionnent simultanément pendant 15 minutes.

Pour les prélèvements d'ambiance, les biocollecteurs utilisés sont placés sur des trépieds réglés à 1,3 m de haut, de sorte d'être à la hauteur du mufle d'un veau debout sur le caillebotis. Ils sont placés juste devant les cornadis en face du tapis où se couchent les veaux, en dehors de la case pour des raisons de sécurité du matériel. Les veaux ne sont pas contenus et sont libres de circuler dans toute la case pendant le prélèvement.

Pour les prélèvements individuels, les veaux sont placés dans une niche dont le sol est recouvert d'un tapis en caoutchouc et dont toutes les ouvertures sont fermées. La niche est un espace fermé de superficie de 2 m² et de volume 2 m³. Au niveau de la porte d'entrée, un sachet est rabattu et empêche les veaux de sortir mais la fermeture n'est pas hermétique. Au fond et au plafond de la niche, au niveau des bouches d'aération, des tubes d'échappement flexibles en acier permettent le branchement des biocollecteurs d'air.

Dans l'ordre, chaque jour, après le repas des veaux, un prélèvement d'ambiance dans la pièce est d'abord réalisé. Ensuite, chaque veau passe individuellement dans la niche pour un prélèvement individuel. Les deux approches sont ainsi intercomparées en conditions contrôlées.

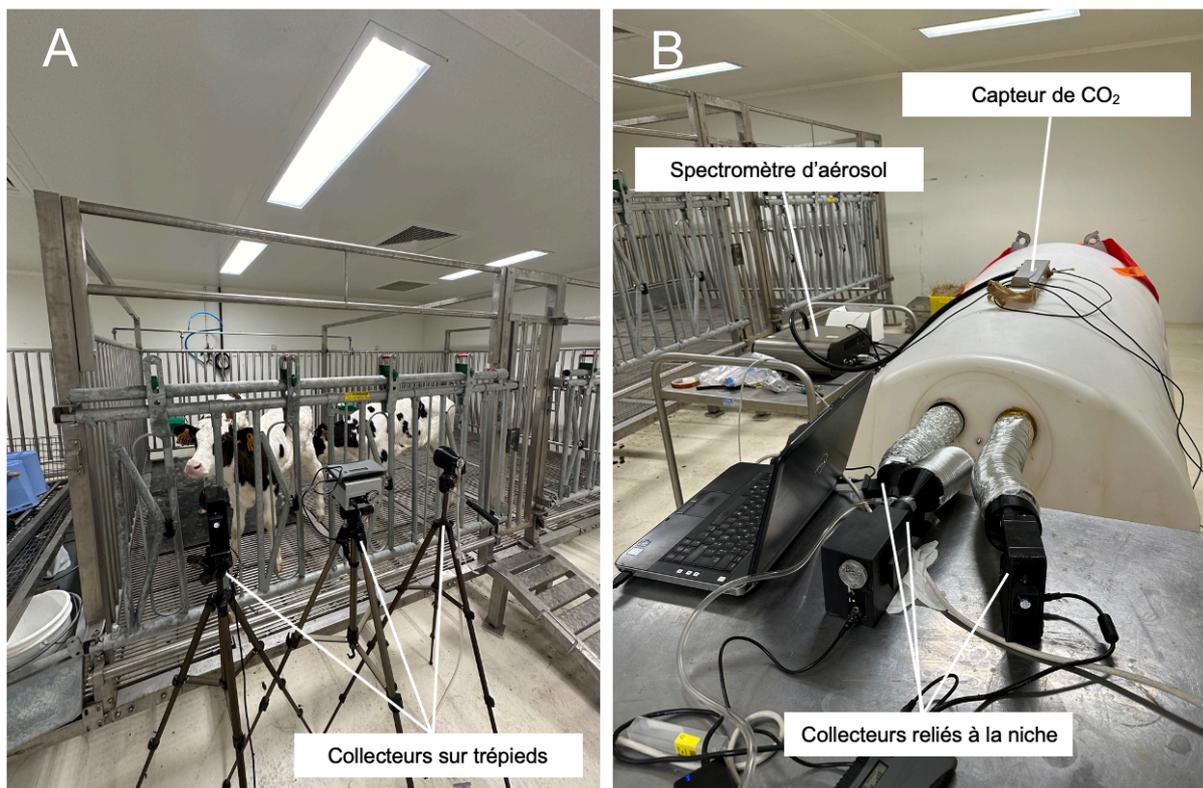


Figure 16 : Conditions de prélèvement. (A) Prélèvement d'ambiance dans l'air de la pièce, face à l'aire de repos, en dehors de l'aire de vie. (B) Prélèvement individuel en niche fermée. Crédit photo : photos originales.

5.2. Biocollecteurs utilisés

Lors des deux phases expérimentales, l'objectif est d'évaluer globalement la collecte virale dans l'air avec des collecteurs commerciaux, et en comparaison, d'évaluer un prototype mis au point par le CEA. Deux biocollecteurs commerciaux ont été utilisés pour les prélèvements réguliers (phase 1) voire quotidiens (phase 2) : le précipitateur électrostatique Biodosi (CEA) et le collecteur à filtre en gélatine Button Sampler (SKC Ltd). Deux collecteurs issus du projet Arise de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) ont été adaptés par le CEA aux besoins de la campagne et ont été également utilisés pour les prélèvements. De façon ponctuelle, l'impacteur à fentes Sioutas® (SKC Ltd) a également été utilisé lors de la 2^{ème} phase expérimentale. Le fonctionnement des collecteurs utilisés est décrit dans la partie bibliographique introductive ; à l'exception du module Arise qui est décrit dans le paragraphe suivant (5.3.).

Les prélèvements sont réalisés en station expérimentale de niveau 3 de biosécurité (unité IHAP) chez les veaux préalablement infectés avec le BCoV. L'excrétion est évaluée sur une durée de 4 à 8 jours et mesurée à différentes dates de cette période pour faire varier la quantité de virus à détecter, en collectant des échantillons de différentes charges virales dans l'air.

Tous les biocollecteurs sont paramétrés pour fonctionner avec un débit d'air de 15 L/min et équipés d'un cône de prélèvement identique.

Entre les prélèvements individuels, la niche est ventilée de sorte à faire diminuer le taux de CO₂ et la quantité de particules afin de réduire au maximum la contamination croisée entre veaux.

5.3. Description et fonctionnement général de la balise Arise

Le CEA a mis au point et adapté aux besoins de la campagne un nouvel équipement pour la détection de BCoV dans l'air expiré par les jeunes bovins ; l'appareil est initialement issu du projet Arise de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Cet appareil dispose d'un cône de prélèvement. Des cartes microfluidiques sont insérées dans l'appareil. Il fonctionne grâce à un flux d'air généré par la carte microfluidique et relayé par un système de ventilation intégré, pouvant collecter de l'air à un débit de 3 à 20 L/min.

Deux types de cartes microfluidiques ont été conçues successivement. Pour la preuve de concept, des cartes permettant uniquement la collecte des particules en suspension dans l'air. Dans la carte microfluidique, grâce au flux d'air généré par le champ électrostatique, la capture des particules en suspension dans l'air est provoquée par précipitation électrostatique sur une membrane hydrophile mixte composée de cellulose recouverte d'une fine couche de pâte de silicium conductrice, de poudre de carbone noir et de polymères protéiques. Chaque carte est constituée de deux chambres de collecte distinctes (**Figure 17A**).

Par la suite, une carte microfluidique complète a été mise au point permettant à la fois la collecte et l'élution des particules en suspension dans l'air et la détection virale. La collecte a été optimisée en doublant le débit d'air et la position des électrodes a été modifiée. Sur ces dernières, des réactifs LAMP sont stockés dans une chambre

puis injectés à travers un circuit microfluidique qui passe par la membrane de collecte pour éluer les particules collectées préalablement. L'éluat est récupéré dans un puit. Dans ce puit, une réaction LAMP est opérée et un signal est émis. Ainsi, les étapes d'échantillonnage et d'analyse sont intégrées dans une seule carte microfluidique (**Figure 17B**) actionnée par un instrument portatif (**Figure 17C**).

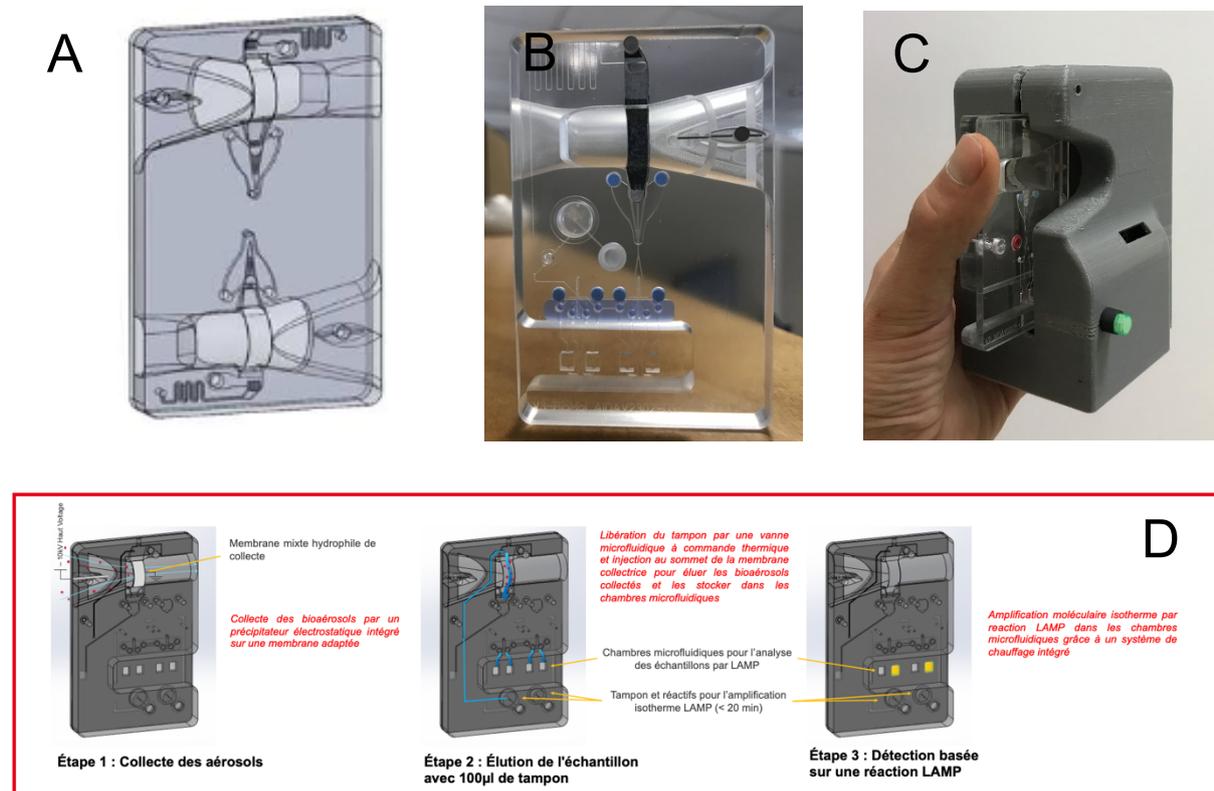


Figure 17 : Module Arise. (A) Carte microfluidique de collecte seule avec deux chambre de collecte distinctes. (B) Carte microfluidique complète intégrant la collecte, l'élution et la détection virale. (C) Module portatif permettant d'actionner une carte microfluidique. (D) Processus de fonctionnement. Source : Poster "Towards detection of airborne pathogenic microorganisms by a micrototal analysis system", Blaire et al., 2023, présenté lors de la 27^{ème} Conférence Internationale sur les systèmes miniaturisés pour la chimie et les sciences de la vie à Katowice (en Pologne).

Pour l'instant les cartes microfluidiques sont à usage unique et jetable ; ce qui évite la contamination croisée lors du prélèvement.

Pour les prélèvements expérimentaux décrits, seules les cartes permettant uniquement la collecte ont été utilisées.

6. Évaluation qualitative de la collecte de particules dans l'air

Pendant les phases de collecte, deux appareils ont permis d'évaluer la qualité de la capture.

Un capteur de paramètres physico-chimiques d'ambiance a permis de suivre en particulier la température, l'humidité et la teneur en CO₂ dans la niche de prélèvement. La teneur en CO₂ (en ppm) est monitorée afin de s'assurer que l'air de la niche se sature par l'air expiré par le veau lors du prélèvement, mais également pour s'assurer que l'air de la niche est renouvelé convenablement entre les prélèvements de deux veaux successifs.

Un spectromètre de particules MiniWRAS (Grimm) sert à l'analyse physique des aérosols au cours de la collecte en temps réel. Grâce à la combinaison de détection de particules optique (OPC) et électrique (nanosiseur), il fournit la distribution granulométrique des particules PM₁₀, PM₄, PM_{2,5} et PM₁ qui sont respectivement les concentrations particulières en µg de particule/cm³ ayant une taille inférieure à 10, 4, 2,5 et 1 µm. Il fonctionne avec un débit de 1,2 L/min.

7. Éluion des échantillons collectés

Les échantillons sont mis en solution dans les 2 heures qui suivent le prélèvement à l'aide :

- Pour la phase 1 : d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) stérile avec du Tween 20® (polysorbate 20 ou monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane) à 0,1% ;
- Pour la phase 2 : d'une solution aqueuse stérile de Tween 20® (polysorbate 20 ou monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane) à 0,1%.

Le Tween 20® est un émulsionnant qui permet d'éluier efficacement les particules virales sans interférer avec les réactifs d'amplification utilisés par la suite.

Pour les ENP, on place l'écouvillon dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et on coupe la tige puis on ajoute 1 mL de la solution. Ce mélange est homogénéisé à l'aide

d'un vortex, deux fois pendant 5 secondes. L'écouvillon est retiré en le pressant sur les parois pour minimiser les pertes de volume.

Les prélèvements d'air sont élués avec 4 mL de solution pour dissoudre les membranes de gélatine du Button Sampler et pour rincer les électrodes de collecte du Biodosi, dans des tubes Eppendorf de 5 mL ; 100 µL de solution sont utilisés pour éluer les particules collectées sur la membrane de l'Arise dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. De la même façon, le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex, deux fois pendant 5 secondes.

Une fois élués, les échantillons sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'étape suivante, si elle n'est pas réalisée immédiatement.

8. Détection des particules virales collectées

Les essais menés ont pour but de permettre de valider non seulement le prélèvement par les biocollecteurs développés au CEA mais aussi l'absence d'interférence des particules présentes dans l'air prélevé pour l'amplification biomoléculaire LAMP. Or l'air ambiant dans les bâtiments d'élevage est relativement chargé en particules en suspension en comparaison des pièces et bâtiments pour lesquels la balise de prélèvement et de détection du CEA a été développée. Les échantillons obtenus lors des prélèvements sont donc analysés par LAMP et, en parallèle, par qPCR. Des prélèvements sont effectués avant l'inoculation, dans des conditions d'air vicié par des poussières de l'élevage, pour évaluer la présence d'éventuels inhibiteurs pour l'amplification biomoléculaire RT-LAMP, avec des quantités connues de cibles.

8.1. Extraction et purification des acides nucléiques

Une fois en solution, une phase d'extraction des acides nucléiques avec purification est réalisée sur les échantillons. Cette extraction est réalisée sur colonne à partir de 100 µL des échantillons mis en solution précédemment à l'aide d'un kit commercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. Cette manipulation consiste à adsorber les acides nucléiques dans une colonne de silice, à

l'aide d'un tampon spécifique et d'éthanol absolu, à rincer toutes les impuretés à l'aide de tampons spécifiques, puis à éluer les acides nucléiques avec de l'eau stérile sans RNase.

Les échantillons après extraction sont conservés au réfrigérateur 4°C pendant au maximum 24h.

8.2. Protocole de RT-qPCR

Pour la RT-qPCR, le kit commercial Bio-TK053 kit® (BioSella) est utilisé. C'est un kit de RT-qPCR duplex qui permet de détecter simultanément le BCoV et l'Influenza D (FluD). Comme indiqué par le fabricant, sur la plaque sont placés, dans les puits d'intérêt, 15 µL de Master Mix prêt à l'emploi et 5 µL de l'extrait d'acides nucléiques des échantillons ou de solution témoins (décrites ci-après).

En parallèle des échantillons à tester, plusieurs contrôles sont indispensables à l'interprétation correcte de la réaction de RT-qPCR :

- Un contrôle négatif de processus (NCS) : l'eau sans RNase remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction. Il permet de valider que les échantillons n'ont pas été contaminés lors de la phase d'extraction.
- Un contrôle négatif d'amplification (NC) : l'eau sans RNase (fournie dans le kit) remplace l'échantillon extrait au moment du dépôt sur la plaque de RT-qPCR. Il permet de valider que les réactifs Master Mix du kit ne sont pas contaminés.
- Un contrôle positif d'amplification des virus ciblés (EPC) : une solution d'ADN synthétique contenant les séquences cibles spécifiques du BCoV et de FluD remplacent l'échantillon extrait au moment du dépôt sur la plaque de RT-qPCR. Il permet de valider que les cycles d'amplification ont bien eu lieu.

La plaque est filmée, centrifugée puis placée dans le thermocycleur LightCycler®96 (Roche Life Science). Le programme de RT-qPCR se déroule avec un cycle de 20 minutes à 50°C, un cycle de 5 minutes à 95°C puis 40 cycles alternant 10 secondes à 95°C et 45 secondes à 60°C. Les canaux de lecture sont le FAM pour BCoV, le VIC pour FluD et le Cy5 pour un contrôle interne de prélèvement suffisant de cellules bovines.

La visualisation des résultats est réalisée sur le logiciel relié au thermocycleur LightCycler®96 (Roche Life Science). Il faut placer la ligne seuil au-dessus du bruit de fond et dans la zone exponentielle d'amplification. Pour valider la série de RT-qPCR, les contrôles doivent fournir des résultats valides comme mentionnés par le fabricant. Dans ce cas uniquement, les résultats des échantillons peuvent être interprétés. Le cycle seuil, nommé Ct, correspond à l'intersection entre les courbes d'amplification et la ligne seuil. Il permet la mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de RT-qPCR entre les échantillons de la même série.

La charge virale est obtenue par la formule : $\text{LOG}((600000 * (10^{(Ct(\text{EPC}) - Ct(\text{échantillon})) / 3,31})))$. La formule permet d'extrapoler le nombre de copies du témoin positif du kit aux échantillons ; les différences de nombre de Ct sont transformées en facteur multiplicatif par rapport au témoin.

8.3. Protocole de RT-LAMP

Le protocole de RT-LAMP décrit par Qiao et al. (Qiao et al. 2012) n'a pas fonctionné pour détecter le BCoV à partir de l'isolat de terrain utilisé pour l'infection expérimentale. Un nouveau protocole a alors été élaboré avec de nouvelles amorces. Les réactifs comprennent 15 µL du mélange Isothermal Master Mix® (OptiGene Ltd) (nouvelle ADN polymérase GspSSD2.0, pyrophosphatase inorganique thermostable exclusive, tampon de réaction optimisé, MgSO, les 4 désoxyribonucléotides triphosphates et un colorant de liaison à l'ADN double brin, détectable dans le canal de fluorescence FAM), 5 µL du mélange d'amorces (2 µL d'eau et 0,5 µL de chaque amorce : F3 et B3 à 10 µM, LF et LB à 50 µM, FIP et BIP à 100 µM) et 5 µL de l'échantillon à tester. Ils sont ajoutés successivement dans les puits d'une plaque, qui est ensuite filmée.

La RT-LAMP est réalisée dans le même thermocycleur LightCycler®96 (Roche Life Science) en 2 phases : une amplification pendant 60 minutes avec 120 cycles de 30 secondes à 65°C, puis une inactivation pendant 2 minutes à 95°C.

8.4. Statistiques pour comparer les deux méthodes

La qPCR commerciale a été choisie comme référence. La concordance entre les tests de détection a ensuite été évaluée par le calcul de la statistique kappa et du pourcentage de concordance positive. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel Excel.

La valeur Kappa de Cohen est calculée à l'aide de la formule : $\kappa = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$ où p_o est l'accord relatif observé entre les méthodes et p_e la probabilité hypothétique d'accord fortuit. Les valeurs ont été interprétées comme indiquant la force de l'accord tel que défini par Altman : $< 0,20$ = faible ; $0,21$ à $0,40$ = passable ; $0,41$ à $0,6$ = modéré ; $0,61$ à $0,80$ = bon et $0,81$ à $1,00$ = très bon (Altman 1990).

9. Isolement viral en culture et évaluation de l'infectiosité

Pour évaluer si le BCoV collecté par les différentes méthodes est vivant et infectieux, les échantillons de collecte du jour 3 de la phase 1 sont utilisés.

9.1. Pré-traitement des échantillons

Les échantillons élués sont dilués au quart dans du PBS avec du Tween 20® à 0,01% en normalisant la quantité de virus. Un échange de tampon est réalisé avec des filtres Amicon dont les pores laissent passer les molécules jusqu'à 30kDa, sur un volume final de 5 mL. 300 μ L de l'éluat est mélangé avec un milieu de lignée cellulaire hRT18g et stérilisé sur filtre pour obtenir un volume final de 1 mL. Dans une plaque à puits, pour chaque échantillon en double, sont placés :

- 100 μ L du mélange stérilisé sur filtre ;
- 1 mL de milieu de culture à sérum réduit OptiMEM avec 2% de PS et de l'amphotéricine B (anti-fongique).

9.2. Mise en culture

Les plaques sont mises en culture avec 2 passages. Un lavage de la culture est réalisé une fois, 24 heures après l'infection pour éliminer l'inoculum.

9.3. Détection

Six jours après l'infection, 150 µL de surnageant est récupéré. L'ARN est extrait avec le kit commercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Une RT-qPCR avec le kit commercial Bio-TK053 kit® (BioSella) est effectuée. En parallèle, les virus sont mis en évidence par immunofluorescence. La présence de virus est établie par comparaison avec un témoin négatif.

10. Euthanasie et autopsie

À la fin de la phase expérimentale, les veaux sont euthanasiés en dehors de la présence des autres veaux, avec une injection par voie intra-veineuse lente dans la veine jugulaire de T-61® (embutramide, mébézonium, tétracaïne) à la posologie de 6 mL pour 50 kg de poids vif comme recommandé dans le résumé des caractéristiques du produit.

Les cadavres sont évacués selon les procédures de biosécurité jusqu'à la salle d'autopsie. Une autopsie ciblée sur l'appareil respiratoire profond est pratiquée. Une ouverture propre de la cavité thoracique permet d'extraire la partie terminale de la trachée, les poumons et le cœur. Une fois le cœur séparé des poumons, les poumons sont rincés et examinés précisément, en particulier leur consistance. Des prélèvements du lobe crânial droit de tous les veaux sont systématiquement effectués, dans des zones de potentielle atélectasie : un prélèvement cubique de 1 cm de côté est conservé dans un pot rempli de formol pour un examen histopathologique, deux prélèvements rectangulaires de 2 à 3 cm de côté sont congelés à plat pour une extraction d'ARN.

Les cadavres sont ensuite évacués par le service d'équarrissage.

III. Résultats

1. Description analytique des bovins recrutés pour l'étude

Dans chaque phase expérimentale, trois bovins ont été recrutés ; soit six bovins au total. Les principales caractéristiques des bovins sont rassemblées dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Caractéristiques des bovins.

Pour les races, PH = Prim'Holstein et RH = Red'Holstein. Pour le sexe, M = mâle. Les âges correspondent à l'âge au J0 de l'étude. Les poids sont évalués après l'euthanasie et avant l'autopsie.

Phase expérimentale	Numéro d'identification national	Référence	Race	Sexe	Date de naissance	Âge (jours)	Poids vifs (kg)
Phase 1 : Juillet 2022	FR3100641749	#49	PH	M	25/06/22	22	58
	FR3100641750	#50	PH	M	29/06/22	18	53
	FR3100641751	#51	PH	M	03/07/22	14	58
Phase 2 : Octobre 2023	FR3100583096	#96	PH	M	20/08/23	43	65
	FR3100583101	#101	PH	M	25/08/23	38	56
	FR3100583112	#112	RH	M	13/09/23	19	43

Les veaux sont âgés en moyenne de 25 jours au début de l'étude et pèsent en moyenne 55,5 kg.

2. Infection virale chez les veaux à la suite de l'inoculation expérimentale d'une souche de BCoV

En l'absence de modèle d'infection expérimentale établi pour le BCoV, il a fallu dans un premier temps valider le protocole d'inoculation expérimentale utilisé.

2.1. Charge virale

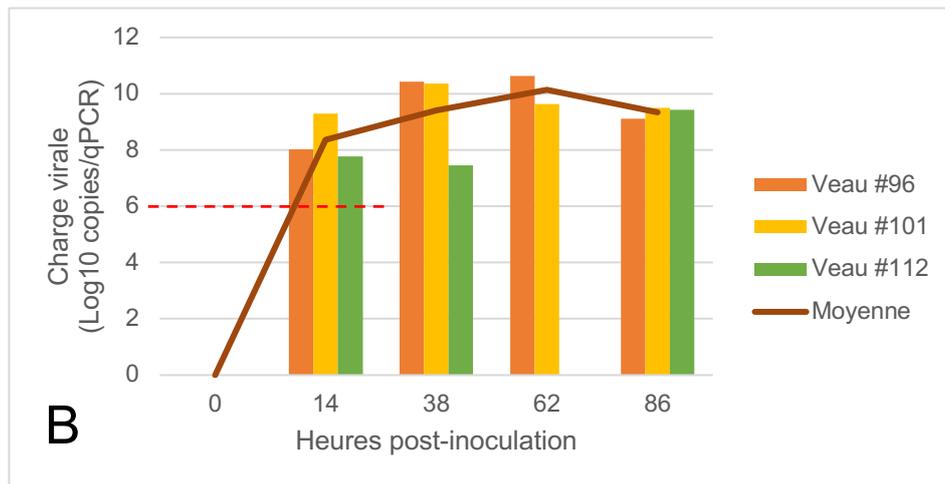
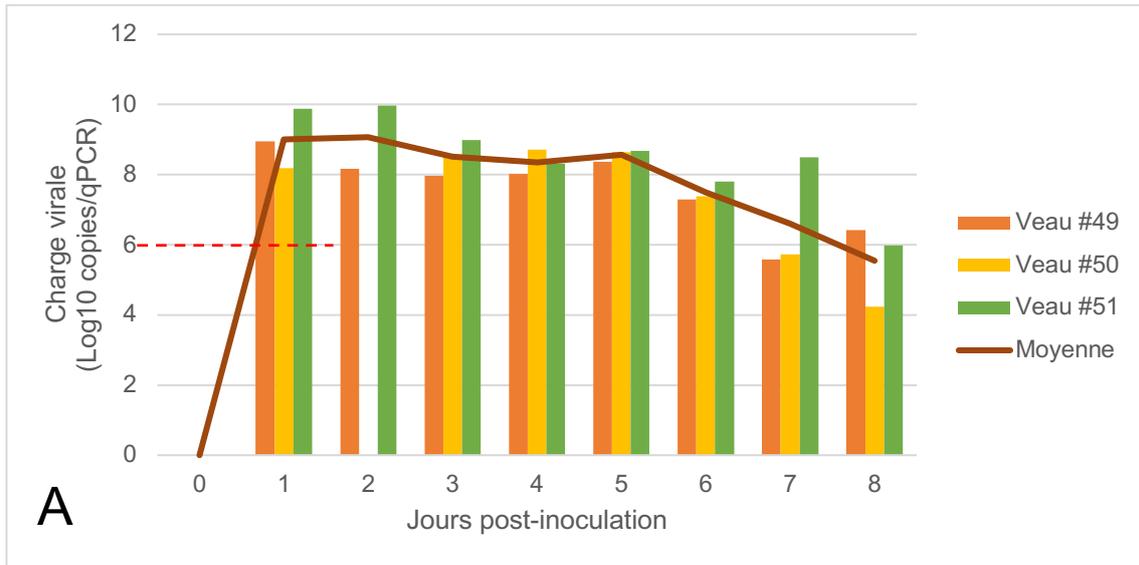


Figure 18 : Charge virale évaluée sur des écouvillons nasaux profonds analysés en qPCR en fonction du temps écoulé après l'inoculation expérimentale de BCoV. (A) Phase expérimentale 1, juillet 2022 (n=3). (B) Phase expérimentale 2, octobre 2023 (n=3). La ligne en tiret rouge représente la charge virale inoculée dans chaque narine.

À la suite de l'inoculation expérimentale d'une souche de BCoV isolée sur le terrain en 2014, le BCoV a été détecté à partir de l'écouvillonnage nasal profond par qPCR dans les cavités nasales des six veaux de l'étude. La charge virale varie entre 10^4 et 10^{10} copies virales au cours du temps pour les deux phases expérimentales. L'excrétion de BCoV dans les cavités nasales est permanente, jusqu'aux jours 8 et 4 respectivement dans les phases expérimentales 1 et 2 ; et semble décroissante à partir du jour 5 dans la phase 1.

L'absence d'excrétion pour les veaux #50 au J2 de la phase 1 et #112 à H62 de la phase 2 est probablement due à un problème d'inhibition ou de prélèvement car du virus est détecté les jours précédant et suivant le jour où le résultat est négatif.

2.2. Manifestations cliniques

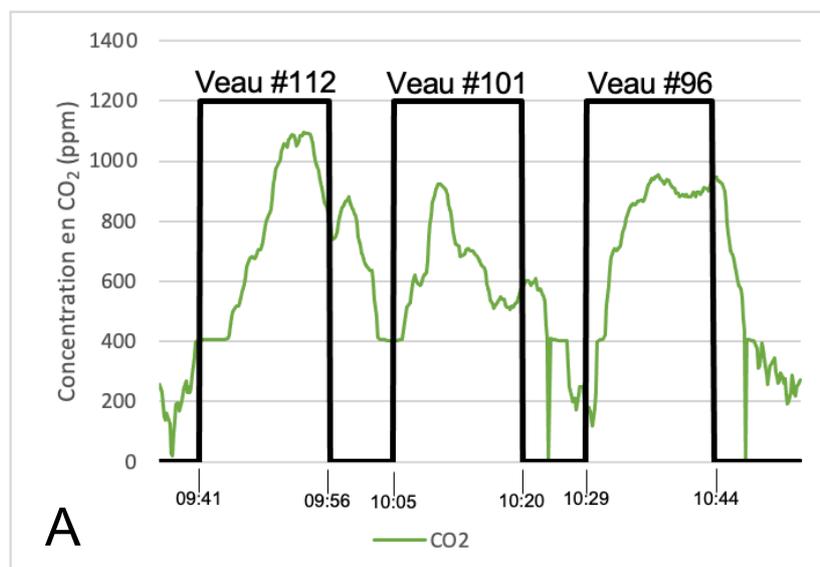
Au cours du suivi clinique des veaux, aucune anomalie clinique respiratoire n'a été relevée, à l'exception pour les six veaux de jetage nasal muqueux à partir du 3^{ème} jour. Pour les veaux de la phase 2, de la diarrhée mucoïde est apparue le dernier jour.

Les éléments cliniques sont reportés en Annexe 1.

3. Résultats de collecte des aérosols dans la niche

Afin de valider les conditions de prélèvement individuelles, il faut s'assurer qu'au moment de l'entrée du veau dans la niche, les concentrations de CO₂ et de particules ont été mesurées. Elles restent élevées au cours des 15 minutes de capture. À la fin du prélèvement, lorsque le veau sort de la niche, il faut s'assurer inversement que ces concentrations diminuent jusqu'à retourner aux valeurs initiales avant de faire rentrer le veau suivant pour éviter les contaminations croisées entre veaux.

Les graphiques présentés dans la **Figure 19** sont représentatifs des données obtenues chaque jour lors des deux phases expérimentales.



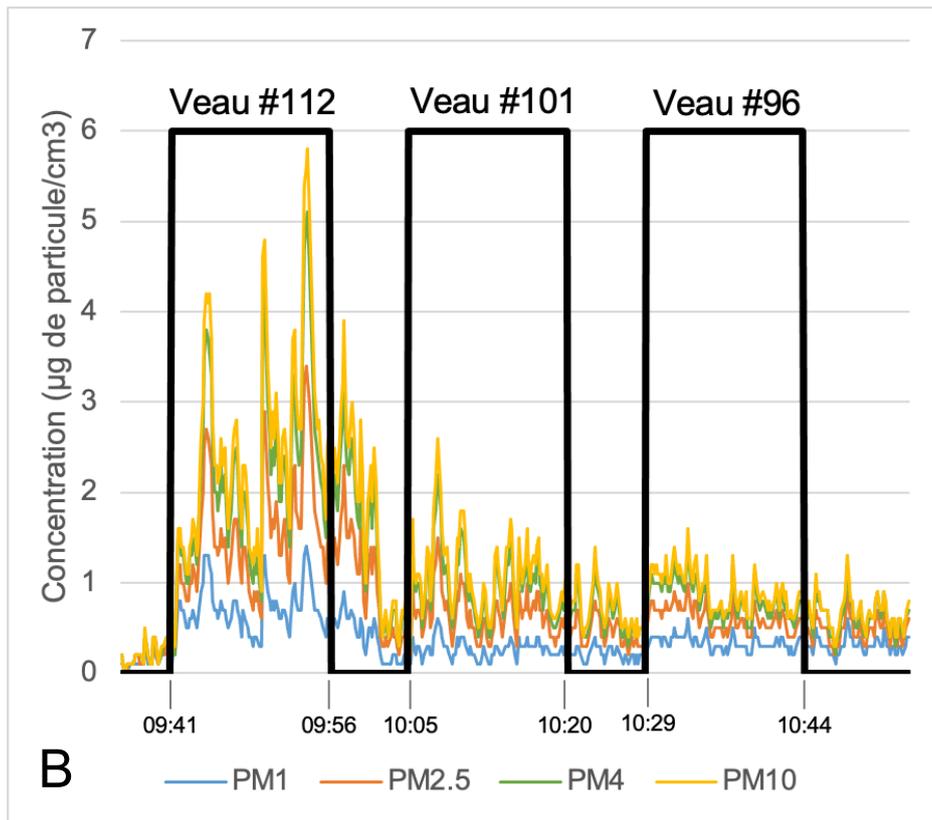


Figure 19 : Évaluation de la collecte selon deux mesures réalisées le 2^{ème} jour de collecte de la phase 2 en octobre 2023. (A) Évolution de la concentration en CO₂ en fonction du temps. (B) Distribution granulométrique des concentrations en particules en fonction du temps.

La **figure 19** montre que lors des phases de prélèvements, les veaux respirent en expirant du CO₂ et émettent en parallèle des particules dans l'air collecté dont les tailles sont comprises entre 0 et 10 µm. La quantité de particules émises est différente entre les veaux.

4. Résultats de la détection sur l'animal pris isolément

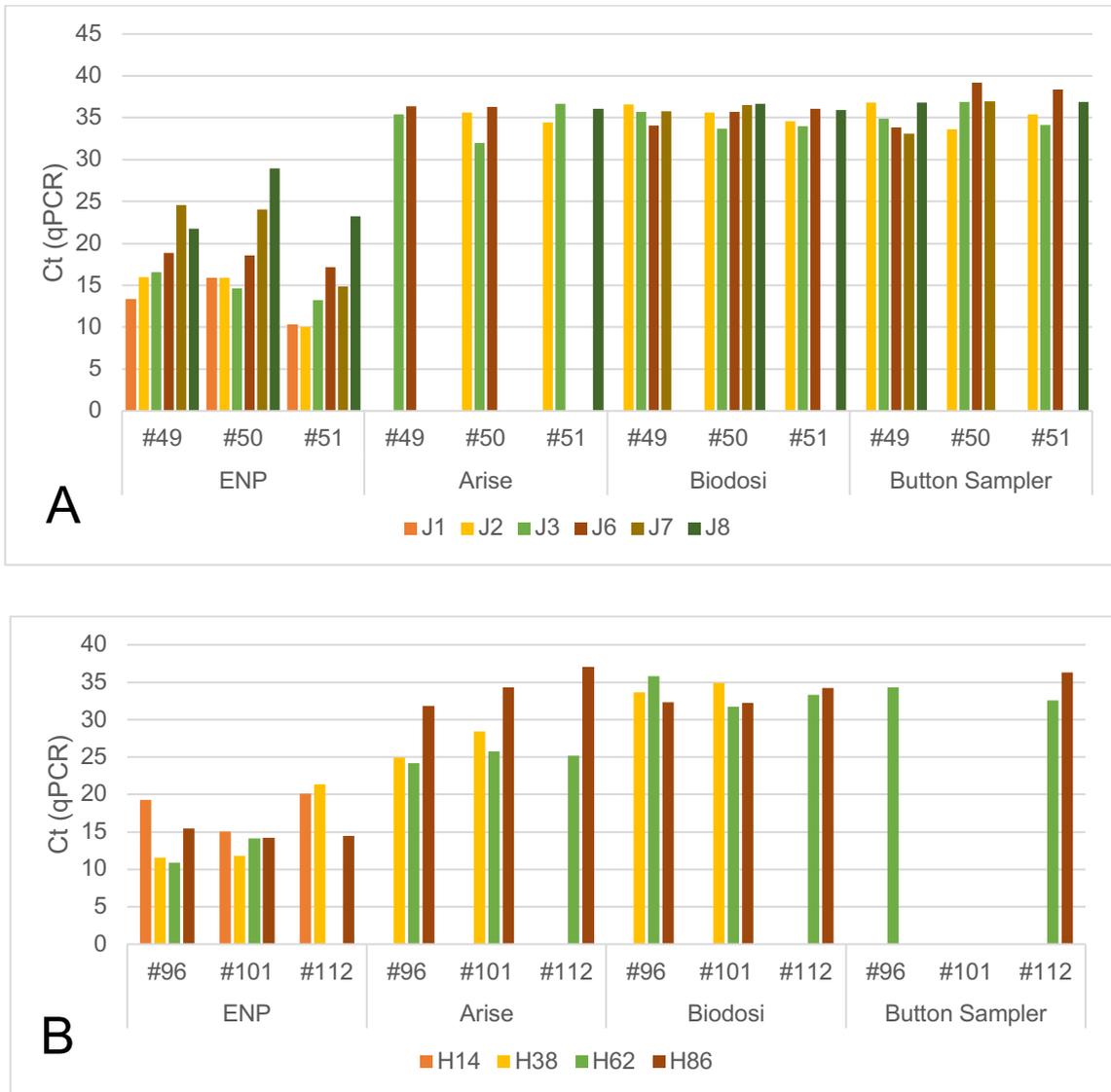


Figure 20 : Seuil de détection par qPCR du BCoV à partir des prélèvements nasaux (ENP) et de l'air de la niche à l'aide des trois collecteurs (Arise, Biodosi, Button Sampler) en fonction du temps post-infection. (A) Lors de la phase 1, avec une échelle de temps post-infection en jours (n=3). (B) Lors de la phase 2, avec une échelle de temps post-infection en heures (n=3).

Quelle que soit la phase expérimentale, de l'ARN viral a été détecté dans les cavités nasales (ENP) des six veaux dès le 1er jour (#49, #50, #51) et 14 heures (#96, #101, #112) après infection respectivement ; à l'exception de l'ENP du veau #112 à 62 heures post-infection.

Lors de la phase 1 (**Figure 20A**), de l'ARN viral a été détecté dans l'air de la niche à partir du 2^{ème} jour post-infection (J2) pour les 3 veaux (#49, #50, #51).

Lors de la phase 2 (**Figure 20B**), de l'ARN viral a été détecté dans l'air de la niche à partir de la 38^{ème} heure post-infection (H38) pour les veaux #96 et #101 ; à partir de la 62^{ème} heure post-infection pour le veau #112.

4. Résultats de la détection dans l'air ambiant de la pièce d'hébergement

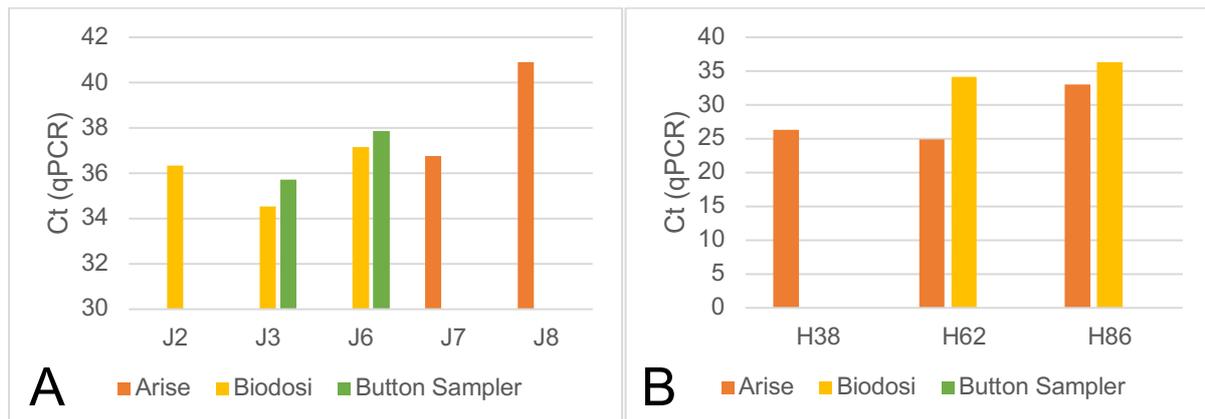


Figure 21 : Seuil de détection par qPCR du BCoV dans la pièce à partir des prélèvements d'air des trois collecteurs en fonction du temps post-infection. (A) Lors de la phase 1, avec une échelle de temps post-infection en jours (n=1). (B) Lors de la phase 2, avec une échelle de temps post-infection en heures (n=1).

Lors des deux phases expérimentales, les prélèvements de l'air ambiant de la pièce ont parfois permis la détection de matériel viral. Le Button Sampler s'est montré moins performant dans les deux cas. Lors de la phase 1, le Biodosi, à l'inverse, a été le plus précoce dans la capture de BCoV dans l'air ambiant de la pièce mais étonnement, n'a pas collecté de virus les deux derniers jours. Lors de la phase 2, le Biodosi a capturé du virus à partir de 62 heures post-infection.

Lors de la phase 1, le module Arise n'a permis la détection du BCoV dans l'air ambiant de la pièce que tardivement, à partir des 7^{ème} et 8^{ème} jours post-infection. Alors que dans la phase 2, il s'est avéré plus précoce que le Biodosi et a capturé du virus dès 38 heures post-infection.

5. Comparaison des résultats de détection par l'amplification LAMP par rapport à la qPCR commerciale

Les méthodes de détection du BCoV, qPCR et LAMP, sont comparées uniquement à partir des prélèvements d'air et nasaux réalisés sur les veaux de la phase 2 (#96, #101, #112).

5.1. Accord des méthodes de détection et calcul des valeurs de sensibilité et de spécificité de la LAMP

Sur 83 échantillons parmi tous les prélèvements confondus réalisés lors de la 2^{ème} phase expérimentale sur les trois veaux (#96, #101, #112), les effectifs sont reportés dans un tableau de contingence.

Tableau 2 : Tableau de contingence des résultats d'amplification par les méthodes de qPCR et LAMP sur les prélèvements de la phase 2 (n=83). Les cases vertes signifient que les méthodes indiquent le même résultat, les cases oranges des résultats différents.

		qPCR	
		Positif	Négatif
LAMP	Positif	18 (22 %)	1 (1 %) ENP #112 à H62
	Négatif	20 (24 %)	44 (53 %)

À partir de ce tableau de contingence et de tableaux de contingence similaires adaptées aux situations souhaitées, les valeurs Kappa de Cohen et les propriétés de la méthode LAMP ont été calculées et sont rassemblées dans le **tableau 3** ci-dessous.

Tableau 3 : Tableau rassemblant l'accord Kappa de Cohen de la LAMP avec la référence de qPCR et les propriétés de la LAMP lors de la phase 2 de l'étude.

	Valeur Kappa de Cohen	Sensibilité de la LAMP (%)	Spécificité de la LAMP (%)
Tous prélèvements (n = 83)	0,47	47	98
ENP (n = 15)	0,81	100	97
Arise (n = 20)	0,66	64	100
Biodosi (n = 20)	0	0	100
Button Sampler (n = 20)	0	0	100

- *Tous les échantillons :*

Sur l'ensemble des échantillons, la valeur Kappa de Cohen est de 0,47. L'accord entre les méthodes LAMP et qPCR sur l'ensemble des prélèvements confondus est donc modéré.

Sur l'ensemble des échantillons, la sensibilité de la LAMP est de 47% dans notre étude. Parmi les 20 échantillons considérés comme faux négatifs (négatifs en LAMP et positifs en qPCR), la plupart sont des prélèvements tardifs à 62 et 86 heures post-infection (sauf 2 à 38 heures post-infection) et tous ont un Ct compris entre 31,75 et 37,06 cycles ; c'est-à-dire un nombre de copies virales faible. Ainsi la LAMP est moins sensible que la qPCR.

La spécificité est de 98 %. On pourrait quasiment considérer qu'elle est de 100% si on admet que l'analyse qPCR de l'ENP du veau #112 à 62 heures post-infection a été inhibée mais est en réalité positive au BCoV (cf. Résultats paragraphe 2.1.).

- *Sur les écouvillons nasaux profonds :*

Sur les 15 échantillons préparés à partir des ENP des veaux, la valeur Kappa de Cohen est de 0,81. Ainsi, l'accord entre les deux méthodes est très bon pour les ENP.

La sensibilité de la LAMP sur les ENP est de 100 % dans notre étude. La spécificité est de 97 % voire 100% si on prend les mêmes considérations décrites précédemment.

- *Sur les échantillons d'air collectés par le module Arise :*

Sur les 20 échantillons d'air collectés par le module Arise, la valeur Kappa de Cohen est de 0,66. Ainsi, l'accord entre les deux méthodes est bon pour les échantillons Arise.

La sensibilité de la LAMP sur les échantillons d'air Arise est de 64 % dans notre étude, alors que la spécificité est de 100%.

5.2. Seuil de détection du BCoV

Dans cette partie, on ne s'intéresse qu'aux échantillons ayant produit un résultat positif par la méthode LAMP ; sont donc exclus les échantillons d'air capté par le Biodosi et le Button Sampler.

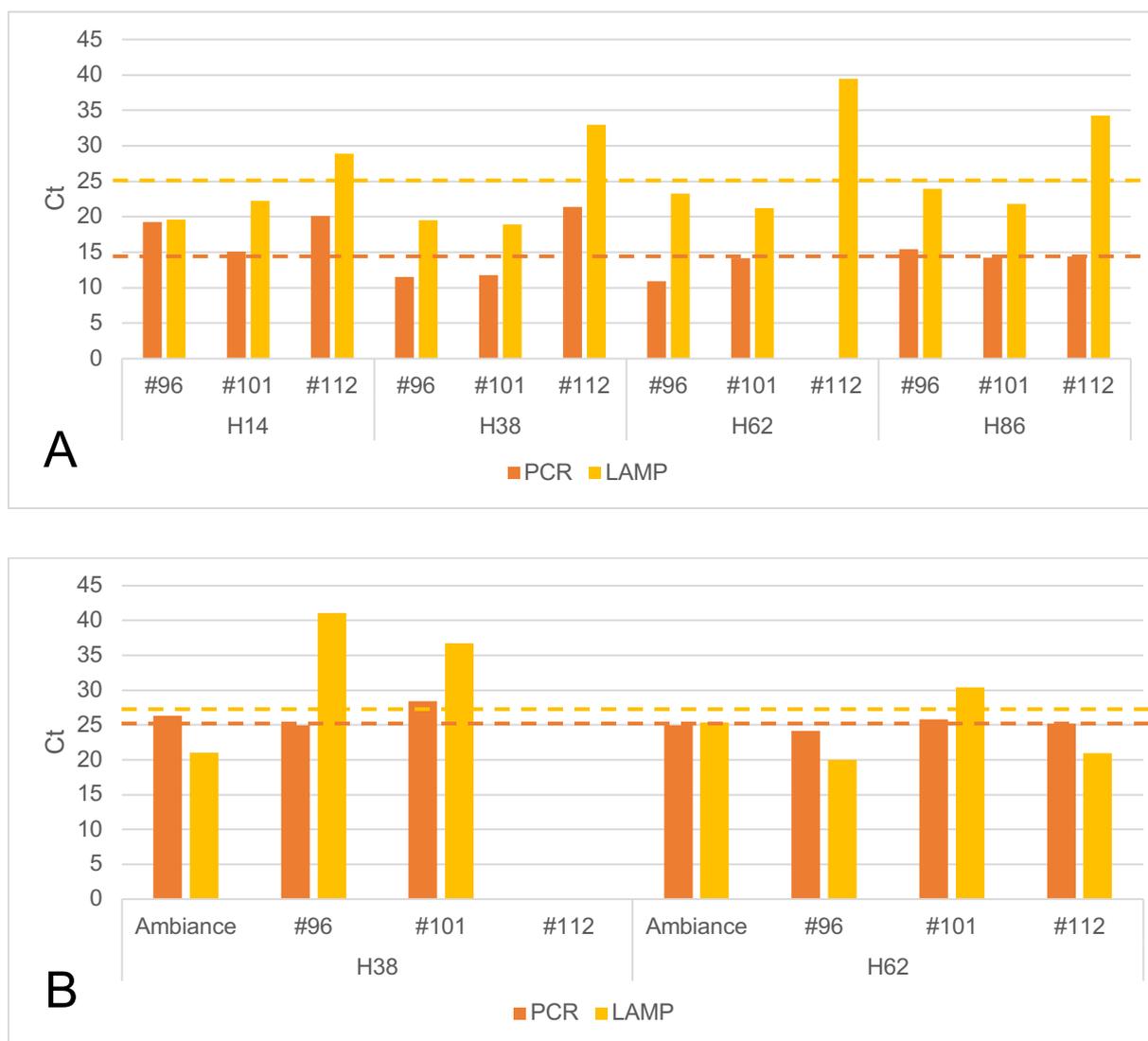


Figure 22 : Seuil de détection du BCoV en fonction du temps post-infection (en heures) par les deux méthodes de détection (qPCR et LAMP) pour les veaux de la phase 2 (#96, #101, #112).

(A) Sur les échantillons issus des écouvillons nasaux profonds. (B) Sur les échantillons d'air collectés par le module Arise.

- *Sur les écouvillons nasaux profonds :*

Sur les ENP des trois veaux de la 2^{ème} phase expérimentale, la LAMP a amplifié du virus dans tous les cas où la qPCR en a détecté. À 62 heures post-infection, la LAMP a amplifié du virus sur l'ENP du veau #112 alors que la qPCR était négative. Comme précisé précédemment dans ce cas, il y a eu très probablement une inhibition de la qPCR.

A chaque moment après l'inoculation, et pour chaque veau, la valeur de Ct obtenue par la méthode LAMP est significativement supérieure à celle obtenue par la qPCR.

La valeur de Ct moyenne obtenue sur tous les veaux et tous les échantillons post-infection, est de $15,31 \pm 3,54$ cycles pour la qPCR ; contre $25,52 \pm 6,76$ cycles pour la LAMP.

- *Sur les échantillons d'air collectés par le module Arise :*

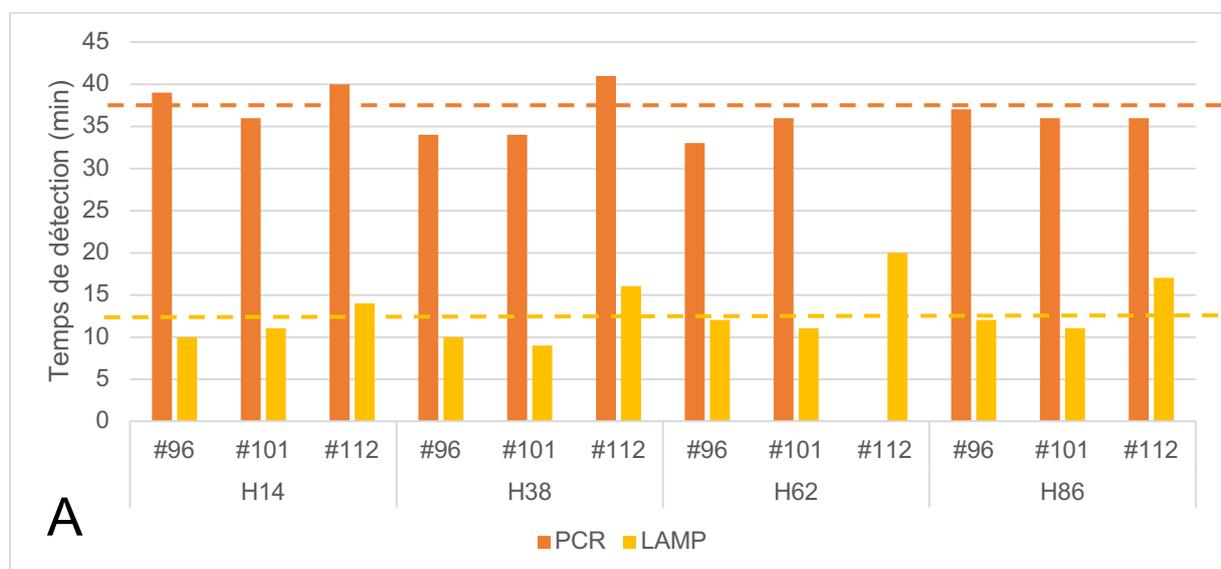
Sur les échantillons d'air Arise des trois veaux de la 2^{ème} phase expérimentale, la LAMP a permis de détecter du virus dans tous les cas où la qPCR en a amplifié, à l'exception des échantillons à 86 heures post-infection.

A chaque moment après l'inoculation et pour chaque veau, la valeur de Ct obtenue par la méthode LAMP est comparable à celle obtenue par la qPCR. La valeur de Ct moyenne obtenue sur ces échantillons, est de $25,67 \pm 1,38$ cycles pour la qPCR et $27,95 \pm 8,40$ cycles pour la LAMP.

Or, si on tient compte que la durée d'un cycle LAMP est de 30 secondes contre 50 secondes pour un cycle de qPCR, les valeurs de Ct sont approximativement les mêmes, la différence réside plutôt dans le temps de détection.

5.3. Temps de détection

De même, dans cette partie on ne s'intéresse qu'aux échantillons avec un résultat positif par la méthode LAMP ; sont donc exclus les échantillons d'air collectés avec le Biodosi et le Button Sampler.



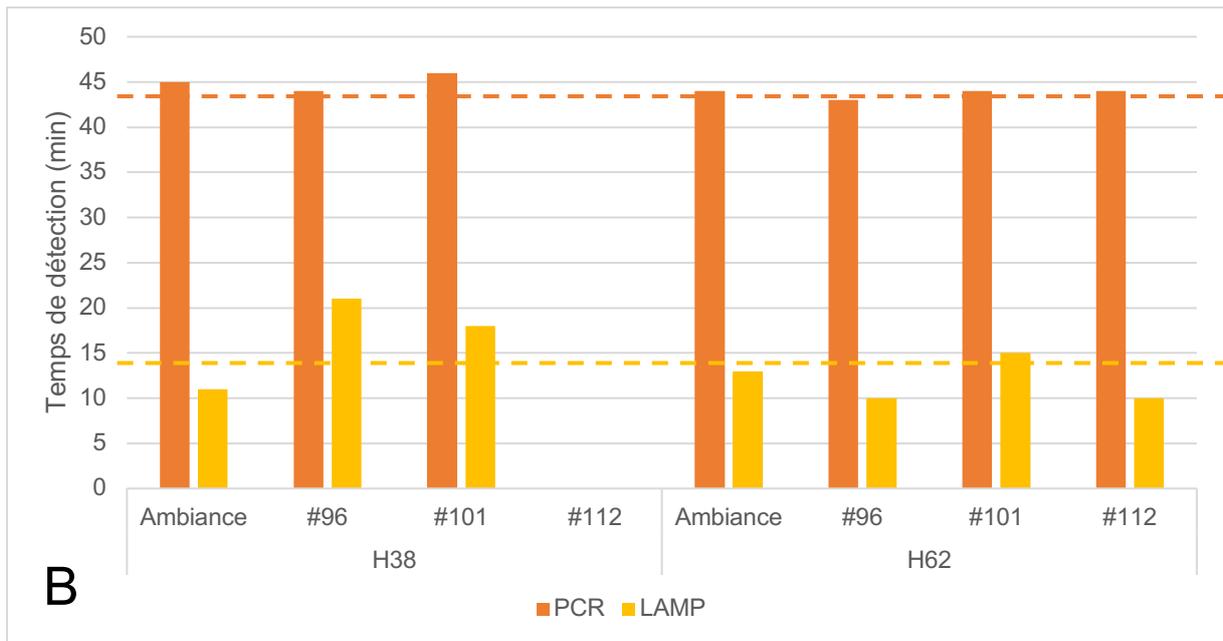


Figure 23 : Durée nécessaire à la détection du BCoV en fonction du temps post-infection (en heures) par les deux méthodes de détection (qPCR et LAMP) pour les veaux de la phase 2 (#96, #101, #112). (A) Sur les échantillons issus des écouvillons nasaux profonds. (B) Sur les échantillons d'air collectés par le module Arise.

- **ENP :**

A chaque moment post-infection et pour chaque veau, la durée nécessaire pour la détection du BCoV avec l'ENP et la méthode LAMP est significativement inférieure à celle de la qPCR. La durée de détection moyenne obtenue sur tous les veaux et tous les prélèvements post-infection, est de 37 ± 3 minutes pour la qPCR ; contre 13 ± 3 minutes pour la LAMP.

- *Sur les échantillons d'air collectés par le module Arise :*

Aux temps 38 et 62 heures post-infection et pour l'air ambiant, et les trois veaux (sauf #112 à H38), la durée nécessaire pour la détection du BCoV dans les échantillons d'air Arise avec la méthode LAMP est significativement inférieure à celle de la qPCR. La durée de détection moyenne obtenue sur ces échantillons, est de 44 ± 1 minutes pour la qPCR ; contre 14 ± 4 minutes pour la LAMP.

6. Résultats sur l'infectiosité de l'air

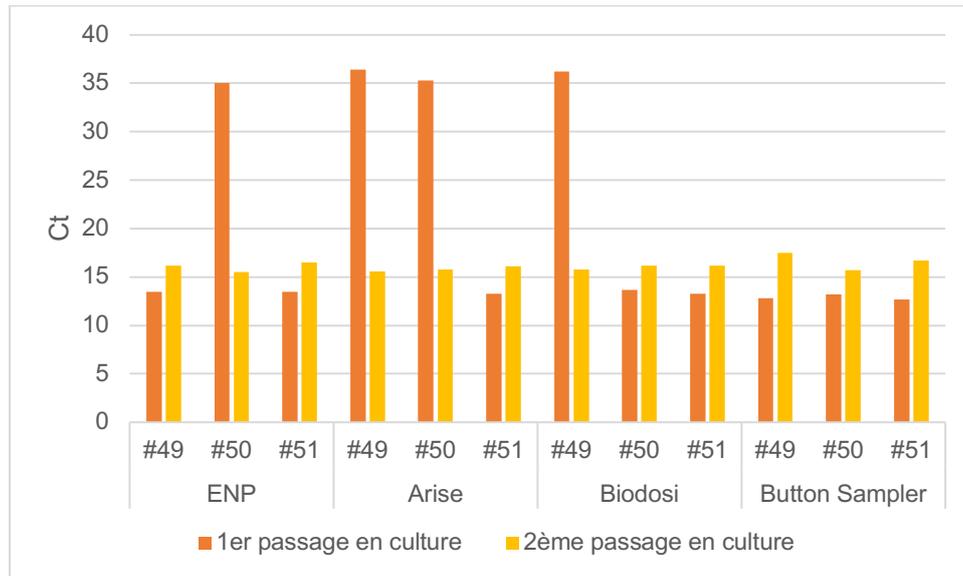


Figure 24 : Seuils de détection en qPCR du BCoV sur les échantillons nasaux et individuel d'air expiré des veaux (#49, #50, #51) du 3^{ème} jour post-infection après un ou deux passages en culture cellulaire.

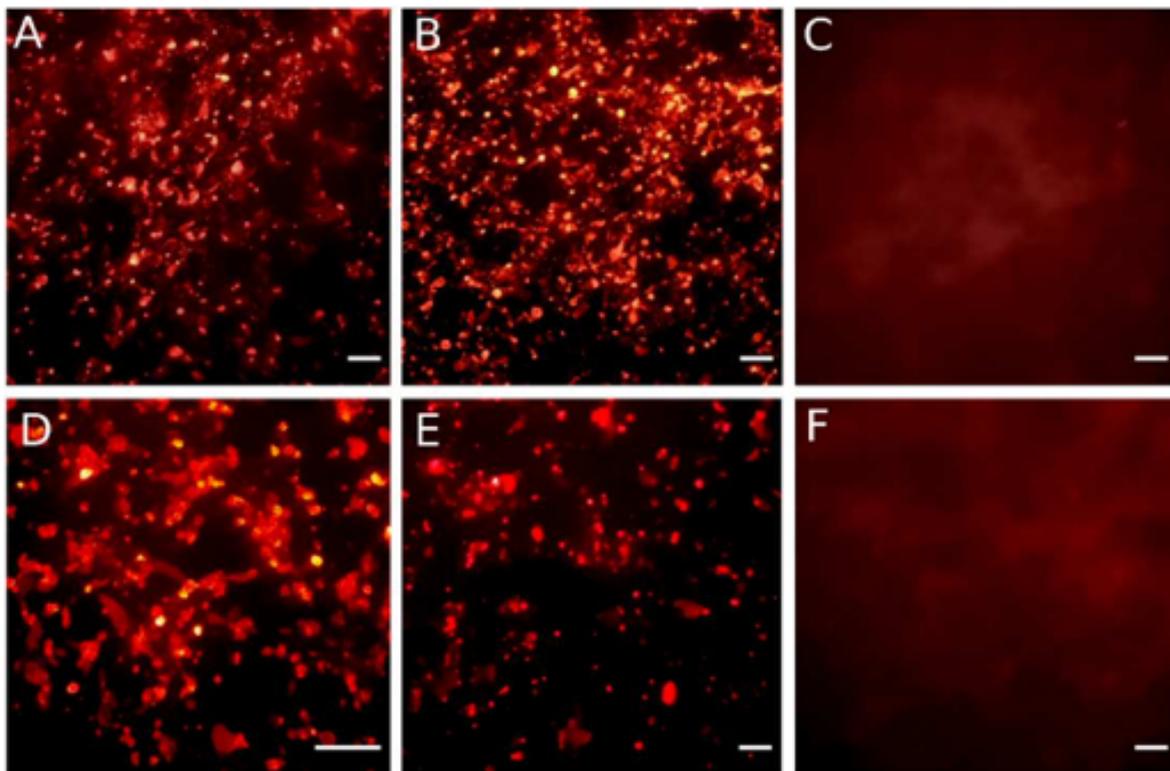


Figure 25 : Exemples de détection du BCoV par immunofluorescence. Passage 1 : (A) et (B) Écouvillons nasaux ; (C) : Module Arise. Passage 2 : (D) Écouvillon nasal ; (E) Module Arise ; (F) Témoin négatif.

Le taux de détection du BCoV après un et deux passage(s) en culture cellulaire est de 100% quel que soit l'animal et le support de collecte. Certains prélèvements ne saturaient pas en immunofluorescence après le premier passage en culture : par exemple, l'échantillon Arise C sur la **figure 25** était comparable au témoin négatif F alors que les écouvillons A et B étaient eux saturés. En revanche, tous étaient saturants après le deuxième passage : par exemple, le même échantillon Arise E après le deuxième passage par rapport au C après le premier passage.

Le virus BCoV collecté dans les cavités nasales et dans les aérosols est vivant et capable de se répliquer en culture cellulaire donc il est infectieux.

7. Résultats de l'autopsie

Très peu de lésions macroscopiques ont été observés sur l'appareil respiratoire des six veaux autopsiés lors de cette étude. Des lésions d'atélectasie légères ont été observées à 8 jours post-infection lors du premier essai, alors qu'aucune lésion n'a été observée lors du 2^e essai à 4 jours post-infection.

IV. Discussion et conclusions de l'étude expérimentale

1. Infection expérimentale par le BCoV et excrétion virale dans l'air expiré

Très peu d'études ont réalisé des infections expérimentales avec le BCoV pour étudier différents aspects de la pathogénie ou encore de la transmission de ce virus. Parmi elles, certaines ont mis en contact direct des veaux naïfs avec des veaux naturellement infectés par le BCoV, d'autres ont réalisé des inoculations de souches virulentes de BCoV souvent par voie orale (Saif et al. 1986; Kapil et al. 1991; Tsunemitsu, Smith, Saif 1999), oronasale (Saif et al. 1986; Cho, Hasoksuz, et al. 2001) et parfois par voie intranasale (Soules et al. 2022).

Dans notre étude, l'inoculation du BCoV dans les cavités nasales (10^6 virus/narine) a conduit au développement rapide d'une infection chez les six veaux (#49, #50, #51, #96, #101, #112), sans symptôme respiratoire jusqu'au 8^{ème} jour pour la moitié d'entre eux, les autres ayant été euthanasiés au 4^{ème} jour.

Une infection par le BCoV se traduit par une excrétion de virus vivant et capable de se répliquer en culture cellulaire dans l'air expiré, y compris en l'absence de symptômes respiratoires et généraux.

Ainsi, l'infectiosité de l'air expiré par des veaux infectés par le BCoV est démontrée.

2. Comparaison des biocollecteurs par rapport aux méthodes de collecte traditionnelles

2.1. Simplicité et rapidité d'exécution

La réalisation du prélèvement de l'air expiré par le veau dans une niche a duré 15 minutes. Pour ce faire, les manipulations de l'animal ont été réalisées par une personne seule, ne requérant pas de compétence particulière, en conduisant l'animal

depuis sa case de vie vers la niche située à quelques mètres de la porte de la case via une passerelle.

En comparaison, la réalisation de l'ENP d'un veau a duré 2 minutes. Pour y parvenir, l'animal a été manipulé par deux personnes. Une première personne a assuré la contention de l'animal dans la position adaptée ; ce rôle ne requiert pas de compétence particulière mais est plutôt physique car il faut tenir un veau de 55 kg immobile et sa tête en extension pour un examen non douloureux mais invasif ; cela implique que le veau essaie de s'y soustraire en se débâtant. Une autre personne réalise le prélèvement nasal et doit donc détenir les compétences vétérinaires adéquates.

Même si la réalisation de l'ENP est moins chronophage, elle nécessite davantage de moyens humains et de compétences médicales vétérinaires et est plus invasive pour l'animal. Ainsi, les méthodes de prélèvement d'air expiré par les veaux dans la niche telles que décrites dans notre étude, permettent de répondre aux objectifs de la ligne directrice du projet AIDAV qui sont une méthode non invasive et pratique d'utilisation.

2.2. Collecte virale

Aussi bien les trois méthodes de prélèvement d'air expiré par les veaux dans la niche et dans la pièce que l'écouvillonnage nasal profond ont permis de collecter du virus vivant et infectieux. La quantité de virus collectée dans l'air et dans les cavités nasales ne sont pas les mêmes.

2.3. Précocité de collecte

D'après les résultats de notre étude résumés sur la **figure 20**, à l'échelle individuelle, quelle que soit la méthode de collecte de l'air expiré par le veau dans la niche, elles ont permis la détection du BCoV à partir de 38 heures post-infection au plus tôt, et de façon variable au cours du temps. Dans les mêmes conditions expérimentales, la méthode de référence d'ENP a permis la détection du BCoV 24 heures plus précocement et de façon quasi-systématique.

En revanche, actuellement, aucune méthode ne permet de détecter en routine les particules virales dans l'air d'un local d'hébergement ou d'un bâtiment d'élevage. Dans notre étude, les prélèvements dans l'air ambiant de la pièce ont parfois permis la détection de matériel viral à partir de 38 heures post-infection au plus tôt, tout comme les prélèvements individuels.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'ENP est plus précoce de 24 heures par rapport aux méthodes de collecte de l'air expiré par le veau dans une niche ou dans l'air ambiant d'une pièce ; cela reste tout de même relativement précoce avec une détection dès 38 heures post-infection. En revanche, elles nécessitent d'être encore optimisées pour garantir une détection plus systématique.

3. Comparaison des biocollecteurs entre eux

3.1. Simplicité et rapidité d'exécution

En termes de durée de prélèvement, la durée de prélèvement avait été fixée arbitrairement à 15 minutes pour tous les biocollecteurs. Par ailleurs, la mise en place des biocollecteurs diffère. Le module Arise est très simple à installer : il suffit d'insérer une carte microfluidique dans l'encoche prévue à cet effet puis abaisser par-dessus la partie du boîtier qui supporte le cône de prélèvement ; puis actionner le bouton démarrant la capture. Pour le Biodosi, sans dissocier le cône de prélèvement, il faut insérer une bague qui sert d'électrode collectrice dans le support prévu à cet effet à l'arrière de l'appareil et remettre le bouchon adapté qui pousse la bague de sorte à la placer au bon endroit dans le dispositif ; puis actionner le bouton démarrant la capture. Le Button Sampler doit être dissocié du cône de prélèvement et la chambre de filtration est ouverte en veillant à soulever le joint d'étanchéité afin de pouvoir insérer minutieusement avec des pinces propres un filtre en gélatine avant de remettre en place le joint, refermer le dispositif et le reconnecter au cône de prélèvement ; puis actionner le bouton démarrant la pompe pour la capture. Il faut savoir que dans des conditions d'humidité élevée, les filtres en gélatine ne sont plus rigides et deviennent difficiles à manipuler. Ainsi, les modules Arise et Biodosi sont plus simples et rapides à installer que le filtre Button Sampler.

3.2. Collecte virale

Les trois méthodes de prélèvement d'air expiré par les veaux ont permis de collecter du virus vivant et infectieux dans la niche et dans le local d'hébergement. Quelle que soit la méthode, le seuil de détection est du même ordre de grandeur ; ainsi, la quantité de virus collectée dans l'air est relativement proche.

En revanche, la première version du module de collecte Arise semblait moins performante que le Biodosi lors des tests en juillet 2022, alors que la technologie est la même. Après son optimisation, le collecteur Arise a été globalement aussi performant que le Biodosi en octobre 2023. Par ailleurs, le Button Sampler s'est avéré moins performant en octobre 2023 qu'en juillet 2022 en comparant H38 à J2 et H62 à J3, à la fois pour le prélèvement d'air dans la niche et dans la pièce. Cela s'explique possiblement par la différence d'humidité lors des manipulations ; en octobre 2023, l'humidité était plus élevée et modifiait la nature des filtres en gélatine du Button Sampler.

En termes de quantité de virus collecté, en raisonnant avec le cycle de seuil de la qPCR, entre juillet 2022 et octobre 2023, les collecteurs commerciaux Biodosi et Button Sampler ont globalement collecté la même quantité à 0,5 cycles près. Le module Arise a amélioré sa valeur de cycle seuil moyenne de 9,9 cycles, c'est-à-dire que sa capacité de collecte est 1000 fois supérieure.

Ainsi, dans les conditions expérimentales décrites, les modules Arise et Biodosi sont plus performants que le Button Sampler pour la collecte virale.

3.3. Précocité de collecte

À l'échelle individuelle, les modules Arise et Biodosi ont permis la détection du BCoV à partir de 38 heures post-infection au plus tôt et de façon quasi-systématique en octobre 2023. Le Button Sampler a permis la détection du BCoV à partir de 2 jours post-infection au plus tôt et de façon quasi-systématique en juillet 2022. Ces observations n'ont pas été confirmées par l'essai d'octobre 2023 en raison des conditions d'humidité qui n'étaient pas optimales pour son utilisation.

En revanche, lors de la capture dans l'air ambiant de la pièce, le module Arise après optimisation s'est avéré plus précoce de 24 heures que le Biodosi, en détectant du BCoV dès 38 heures post-infection contre 62 heures pour le Biodosi.

Ainsi, le module Arise permet une collecte plus précoce que le Biodosi, notamment dans l'air ambiant de la pièce.

3.4. Positionnement de la balise Arise par rapport à l'état de l'art

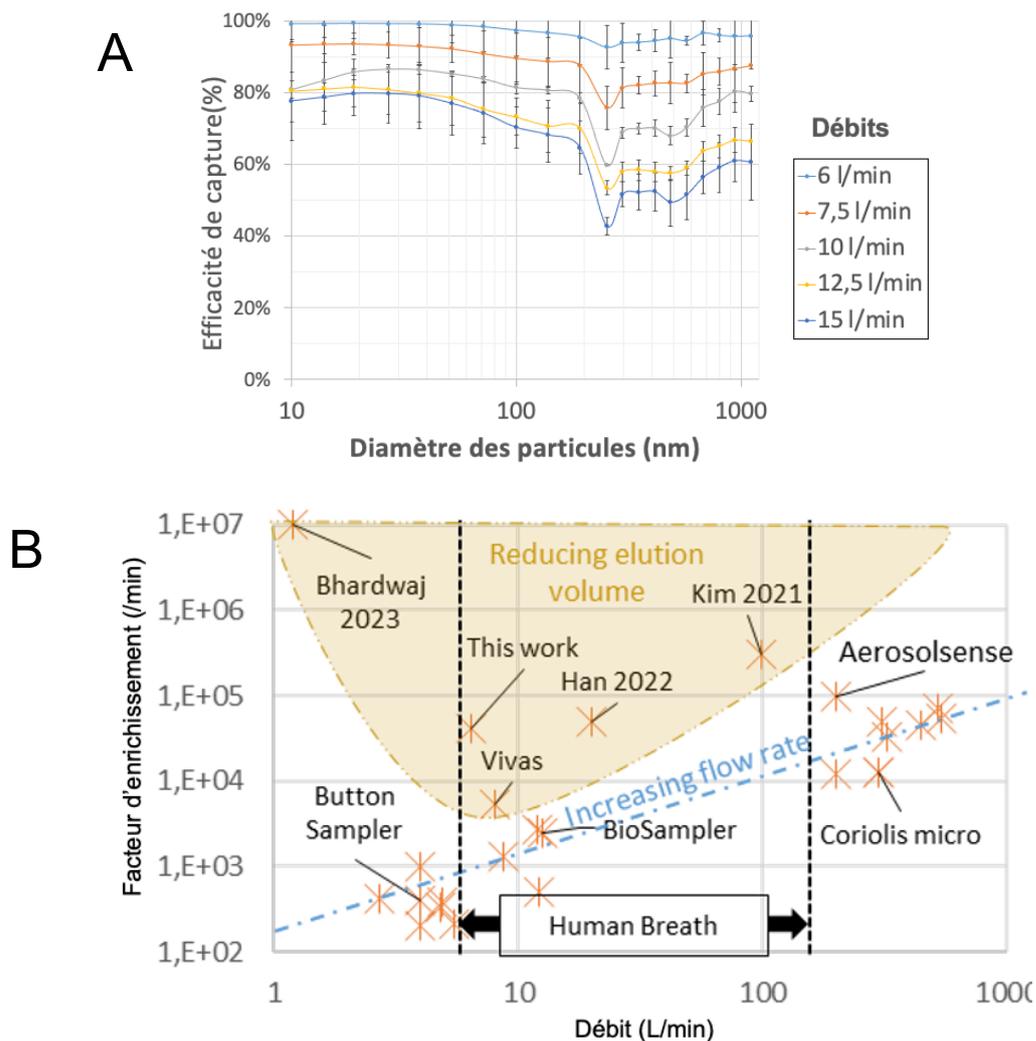


Figure 26 : Efficacité de collecte et d'enrichissement des aérosols par la balise Arise. (A) Efficacité de capture en fonction du diamètre des particules d'aérosols et du débit d'air. (B) Facteur d'enrichissement du module Arise et des instruments commerciaux (Dybwad, Skogan, Blatny 2014; Roux et al. 2016; Pan, Lednický, Wu 2019; Kim, An, Hwang 2020; Horve et al. 2021; Ratnesar-Shumate et al. 2021; Han et al. 2022; Jang, Bhardwaj, Jang 2022) en fonction du débit d'air. Source : Poster "Towards detection of airborne pathogenic microorganisms by a micrototal analysis system", Blaire et al., 2023, présenté lors de la 27^{ème} Conférence Internationale sur les systèmes miniaturisés pour la chimie et les sciences de la vie à Katowice (en Pologne).

D'après la **figure 26**, le système Arise collecte très efficacement toutes les tailles de particules infectieuses, jusqu'à 99 %. De plus, la combinaison de la collecte électrostatique dans un environnement microfluidique améliore considérablement le facteur d'enrichissement. Ainsi, avec un débit modeste, le prototype rivalise avec les meilleurs instruments commerciaux, tout en offrant un moyen d'intégrer les étapes analytiques en aval.

4. Comparaison des méthodes de détection par amplification

4.1. Simplicité d'exécution

Pour la mise en œuvre des méthodes de détection par amplification dans notre étude, la LAMP et la qPCR ont été réalisées à partir des mêmes échantillons. Les étapes de préparation des échantillons comprenant l'élution des particules collectées et l'extraction d'ARN sont donc communes. Ensuite, la préparation des plaques est semblable avec l'utilisation de mélanges de réactifs prêts à l'emploi et l'ajout de l'échantillon à tester. Les amplifications sont réalisées dans le même thermocycleur. Finalement, seuls les programmes d'amplification sont différents mais durent au total 62 minutes. Ainsi, en termes d'exécution les méthodes sont équivalentes.

Par ailleurs, la méthode LAMP est censée par la suite être réalisée de façon autonome dans la balise sur des prélèvements élués mais sans extraction préalable de l'ARN. Dans ce cas, l'exécution serait considérablement simplifiée.

4.2. Fiabilité du résultat

En fixant comme méthode de référence la qPCR commerciale, la méthode de LAMP est respectivement très fiable et fiable pour détecter le BCoV sur les échantillons d'ENP et d'air collecté par le module Arise avec une sensibilité de 100 et 64 % et une spécificité de 97 et 100 % respectivement. La limite de détection est 0,5-2.10⁵ copies de BCoV/réaction sur les échantillons cliniques dans notre étude.

4.3. Durée de détection

Que ce soit sur les ENP ou les prélèvements d'air collectés par le module Arise, la durée de détection de la LAMP est significativement inférieure d'un facteur 3 en moyenne à celle de la qPCR commerciale.

4.4. Coût de l'analyse

Pour calculer le prix de revient des deux méthodes de détection du BCoV dans notre étude, il n'y a pas de sous-traitance par un laboratoire spécifique, les méthodes sont réalisées directement au laboratoire d'immunologie de l'unité IHAP à l'ENVT où un thermocycleur est à disposition.

Les deux méthodes d'amplification comprennent les mêmes étapes d'élution des échantillons collectés et d'extraction de l'ARN et utilisent le même thermocycleur. Les coûts de ces étapes sont donc négligés. La seule différence entre les deux méthodes est la fourniture en réactifs adaptés :

- Les réactifs de qPCR du kit commercial Bio-TK053 kit® (BioSella) reviennent à 10,6 €HT par réaction.
- Les réactifs de LAMP du mélange commercial Isothermal Master Mix® (OptiGene Ltd) et les amorces spécifiques reviennent à 1,3 €HT par réaction.

Ainsi, la LAMP est économiquement 8 fois plus avantageuse que la qPCR.

4.5. Positionnement de la méthode LAMP par rapport à l'état de l'art

La RT-LAMP décrite par Qiao et al. possède une sensibilité de 95 % et une spécificité de 99 % sur 418 échantillons fécaux (Qiao et al. 2012). La RT-LAMP décrite par Mytzka et al. possède une limite de détection de 2000 copies/mL sur des échantillons extraits et purifiés à partir de culture cellulaire infectées par le BCoV (Mytzka et al. 2023). Pour la détection des bactéries d'intérêt respiratoire chez les bovins, Mohan et al. rapportent, à partir d'échantillons nasaux de bovins, une spécificité de 89 % et une sensibilité de 99 % pour leur LAMP (Mohan et al. 2021). Le test développé par Pascual-Garrigos et al. avec des colorants sensibles au pH offre

une sensibilité de 66,7 à 100 % et une spécificité de 100% à partir d'écouvillons nasaux reconditionnés (Pascual-Garrigos et al. 2021).

Ainsi, la méthode LAMP mise au point pour notre étude s'aligne avec les résultats obtenus pour les méthodes décrites dans la littérature en termes de sensibilité et de spécificité. Cependant, la limite de détection du BCoV est encore médiocre et reste à améliorer avant de l'intégrer dans le balise Arise complète. Par ailleurs, en termes de durée de détection les résultats sont prometteurs.

5. Limites

Cette étude présente des limites à plusieurs niveaux détaillés dans les paragraphes suivants.

5.1. Infection expérimentale

Le modèle d'infection expérimentale a été validé plus tôt dans la discussion comme permettant l'excrétion de BCoV vivant et infectieux dans les cavités nasales et dans l'air expiré. Cependant, l'infection a produit que très peu de signes cliniques chez les veaux avec essentiellement des signes de rhinite avec du jetage nasal muqueux, une absence d'hyperthermie et des signes digestifs modérés avec de la diarrhée mucoïde. Avec les critères cliniques, les veaux n'étaient pas malades et dans un élevage, ils n'auraient probablement pas fait l'objet d'une attention particulière. De même, à l'autopsie, ils ne présentaient peu, voire pas, de lésions macroscopiques respiratoires.

5.2. Nombre d'animaux inclus dans l'étude

La commission d'éthique a accordé l'inclusion de six veaux dans le projet. Pour des raisons évidentes de valeur statistique des résultats présentés dans ce travail, le nombre d'animaux est insuffisant.

5.3. Conditions expérimentales

Les conditions dans les locaux expérimentaux ne reflètent pas parfaitement les conditions en élevage notamment, au niveau de la qualité de l'air, en lien avec la méthode utilisée. En effet, dans un élevage l'air contient davantage de particules non désirées en lien avec les pratiques d'élevage comme des poussières de litière.

Par ailleurs, lors de la collecte dans la niche, pendant 15 minutes au débit de 15 L/min, seulement 225 L d'air sont échantillonnés, soit moins de 25% du volume de la niche. De plus, dans la niche, le veau n'est pas forcément face aux collecteurs tout au long du prélèvement.

5.4. Durée de suivi des animaux

Le suivi des animaux a été réalisé sur 8 jours lors de la première phase expérimentale. Dans l'idéal, il aurait pu être poursuivi jusqu'à ne plus détecter d'excrétion dans les cavités nasales et/ou dans l'air expiré afin de mieux cerner les modalités d'excrétion du BCoV, et éventuellement d'évaluer le seuil minimal de collecte et de détection du virus. En effet, sur le terrain, la prise en charge de veaux atteints de MRB a souvent lieu plus tardivement lorsque les surinfections bactériennes sont déjà apparues, et produisent des signes cliniques plus francs. A ce moment-là, les taux d'excrétion de virus sont plus faibles.

Par ailleurs, lors de la deuxième phase expérimentale le suivi des animaux a été réalisé sur seulement 4 jours à des temps de l'infection plus précoces que lors de la phase 1. Cela ne permet pas de superposer les résultats et de les comparer raisonnablement. De plus, comme lors de la phase 1, le suivi des animaux aurait pu être poursuivi au-delà de 10 jours.

6. Perspectives du projet

7.1. Finalisation de la balise entièrement autonome

D'ici janvier 2024, le CEA a pour objectif de finaliser la balise pour qu'elle soit entièrement autonome pour la collecte et la détection du BCoV en sous-traitance avec un bureau d'étude pour les étapes de design et de mise en forme.

7.2. Déploiement de la balise en élevage

La perspective à court terme de ce projet est de déployer la balise complète autonome dans les principaux bassins d'élevage afin de (i) vérifier son opérabilité à l'échelle individuelle et collective et (ii) acquérir des données épidémiologiques sur l'occurrence des MRB impliquant le coronavirus bovin.

Soixante ateliers d'engraissement répartis dans les principaux bassins d'engraissement seront recrutés pour participer à l'étude. Le recrutement pourrait être facilité par l'implication de plusieurs groupements de producteurs très souvent partenaires dans les projets pilotés par F2E ou de structures vétérinaires qui réalisent un grand nombre de prélèvements pour recherche étiologique lors de MRB.

Dans un premier temps, la comparaison des résultats obtenus via la balise embarquée à ceux obtenus par les méthodes d'analyse de référence (écouvillonnages nasaux profonds + qPCR) sera réalisée dans un nombre d'ateliers d'engraissement qui sera déterminé à partir des résultats des essais de preuve de concept. Le nombre de jeunes bovins recrutés sera également adapté en fonction des résultats des premiers essais. Les analyses qPCR seront réalisées par l'IHAP. L'ensemble des partenaires sera impliqué dans l'interprétation des résultats. Cette étape permettra de valider l'utilisation de la balise embarquée en élevage commercial.

Si l'utilisation de la balise embarquée dans les élevages commerciaux est validée, une étude épidémiologique sur la prévalence du BCoV dans les élevages de jeunes bovins pourra être initiée. Des compléments de financements seront néanmoins nécessaires pour une étude d'envergure.

7.3. Évaluation de la perception de la balise autonome par une étude qualitative

Afin de recueillir les visions, freins et motivations des futurs utilisateurs de la technologie (les vétérinaires et les éleveurs engraisseurs de jeunes bovins) des ateliers de démonstration, sous la forme de focus groupes, seront organisés par Idele dans un atelier d'engraissement de jeunes bovins dans plusieurs groupements sélectionnés (Ouest, Centre, Est, Sud). Dans chaque bassin, au minimum 5 vétérinaires et 10 éleveurs engraisseurs participeront aux démonstrations. Le CEA fournira les balises et des cartes microfluidiques de démonstration nécessaires à cette étude.

7.4. Élargissement des cibles pathogènes à détecter et des espèces concernées

Si le déploiement de la balise autonome en élevage est concluant, la perspective est d'élargir les cibles à détecter dans le cadre des MRB : au moins aux virus dont le BRSV et le BPI3V ; voire aux bactéries respiratoires d'intérêt. Sachant, que les biocollecteurs déjà commercialisés sont capables de collecter des bactéries.

De la même façon, si l'utilisation du prototype de façon individuelle et dans l'air d'ambiance est validée sur le terrain, son utilisation pourra être élargie à d'autres types de productions bovines voire à d'autres espèces comme les volailles ou le porc et à leurs pathogènes respectifs.

7.5. Perspectives en médecine humaine

En prenant du recul sur le travail de cette étude, la technologie mise au point dans la balise Arise est innovante et s'inscrit dans la lignée des recherches actuelles en médecine humaine pour la détection des virus dans l'environnement. En se fiant au modèle bovin établi, il pourrait être adapté et développé dans le cadre de la détection de virus d'intérêt comme le SRAS-CoV-2, à l'échelle personnelle voire dans des environnements clos.

CONCLUSION

Le diagnostic étiologique des maladies respiratoires des bovins, troubles de la santé d'importance majeure dans tous les systèmes d'élevage bovin en stabulation, représente un enjeu majeur pour le secteur. Face à son origine multifactorielle, les méthodes actuelles utilisées en routine pour le prélèvement des voies respiratoires et la détection ultérieure des agents pathogènes s'avèrent invasives, chronophages et donnent un résultat trop tardif pour prévoir une prise en charge thérapeutique adaptée.

Dans la littérature récente, la transmission aérienne des virus pathogènes respiratoires a été mise en évidence et établie. L'étude décrite dans ce manuscrit a permis de montrer, dans le cas du coronavirus bovin, l'excrétion de virus vivant et infectieux dans l'air expiré par les veaux. Par ailleurs, dans le contexte de pandémie mondiale du Covid-19 en particulier, plusieurs méthodes de collecte virale dans l'air ont été décrites en médecine humaine mais aucune n'est utilisée à l'heure actuelle en routine dans le cadre du diagnostic étiologique des maladies respiratoires chez les bovins. Le prototype innovant de collecte des aérosols dans l'air, Arise, développé par le CEA et testé expérimentalement dans notre étude, a montré des résultats encourageants. Il remplit les objectifs de collecte fixés par l'étude en termes d'invasivité et de contention minimales lors du prélèvement et de praticité d'utilisation. Très peu de recherches ont réussi à coupler les méthodes de détection aux prototypes de collecte d'aérosol en les intégrant dans un dispositif complet, autonome et portable. La méthode de détection virale mise au point en vue d'être intégrée dans la balise Arise complète, est l'amplification moléculaire linéaire (LAMP) qui est la plus sensible et la plus facilement automatisable. Cette dernière a montré des résultats qui sont améliorables en termes de sensibilité de détection mais prometteurs quant à la durée d'obtention des résultats par rapport aux méthodes décrites dans la littérature.

Finalement, malgré les limites de cette étude, la balise Arise remplit les objectifs fixés initialement et rivalise avec les meilleurs instruments commerciaux, tout en offrant un moyen d'intégrer les étapes analytiques en aval. La méthode de détection par LAMP nécessite quant à elle d'être encore optimisée mais est prometteuse et économiquement intéressante. Elle offre en outre des perspectives intéressantes aussi bien en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine.

BIBLIOGRAPHIE

ABKARIAN, M. et STONE, H. A., 2020. Stretching and break-up of saliva filaments during speech: A route for pathogen aerosolization and its potential mitigation. *Physical Review Fluids*. 2 octobre 2020. Vol. 5, n° 10, pp. 102301. DOI 10.1103/PhysRevFluids.5.102301.

ABKARIAN, Manouk, MENDEZ, Simon, XUE, Nan, YANG, Fan et STONE, Howard A., 2020. Speech can produce jet-like transport relevant to asymptomatic spreading of virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 13 octobre 2020. Vol. 117, n° 41, pp. 25237-25245. DOI 10.1073/pnas.2012156117.

ACQUIER, Andrea Beatriz, PITA, Alejandra Karina De Couto, BUSCH, Lucila et SÁNCHEZ, Gabriel Antonio, 2015. Comparison of salivary levels of mucin and amylase and their relation with clinical parameters obtained from patients with aggressive and chronic periodontal disease. *Journal of applied oral science: revista FOB*. 2015. Vol. 23, n° 3, pp. 288-294. DOI 10.1590/1678-775720140458.

AINTABLIAN, Nectar, WALPITA, Pramila et SAWYER, Mark H., 1998. Detection of Bordetella pertussis and Respiratory Syncytial Virus in Air Samples from Hospital Rooms. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. décembre 1998. Vol. 19, n° 12, pp. 918-923. DOI 10.1086/647764.

AIZENBERG, V, GRINSHPUN, Sergey, WILLEKE, K, SMITH, J.P. et BARON, P.A., 2000. Performance Characteristics of the Button Personal Inhalable Aerosol Sampler. *AIHAJ: a journal for the science of occupational and environmental health and safety*. 1 mai 2000. Vol. 61, pp. 398-404. DOI 10.1080/15298660008984550.

AIZENBERG, V, REPONEN, Tiina, GRINSHPUN, Sergey et WILLEKE, K, 2000. Performance of Air-O-Cell, Burkard, and Button Samplers for Total Enumeration of Airborne Spores. *AIHAJ: a journal for the science of occupational and environmental health and safety*. 1 novembre 2000. Vol. 61, pp. 855-64. DOI 10.1202/0002-8894(2000)061<0855:POAOCB>2.0.CO;2.

ALEKSEEV, Konstantin P., VLASOVA, Anastasia N., JUNG, Kwonil, HASOKSUZ, Mustafa, ZHANG, Xinsheng, HALPIN, Rebecca, WANG, Shiliang, GHEDIN, Elodie, SPIRO, David et SAIF, Linda J., 2008. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *Journal of Virology*. décembre 2008. Vol. 82, n° 24, pp. 12422-12431. DOI 10.1128/JVI.01586-08.

ALLAN, E. M., GIBBS, H. A., WISEMAN, A. et SELMAN, I. E., 1985. Sequential lesions of experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *The Veterinary Record*. 26 octobre 1985. Vol. 117, n° 17, pp. 438-442. DOI 10.1136/vr.117.17.438.

ALLEN, J. W., VIEL, L., BATEMAN, K. G., ROSENDAL, S., SHEWEN, P. E. et PHYSICK-SHEARD, P., 1991a. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. octobre 1991. Vol. 55, n° 4, pp. 341-346.

ALLEN, J. W., VIEL, L., BATEMAN, K. G., ROSENDAL, S., SHEWEN, P. E. et PHYSICK-SHEARD, P., 1991b. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. octobre 1991. Vol. 55, n° 4, pp. 341-346.

ALMSTÅHL, Annica et WIKSTRÖM, Maude, 2003. Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. *Archives of Oral Biology*. mai 2003. Vol. 48, n° 5, pp. 337-344. DOI 10.1016/s0003-9969(02)00200-5.

ALTMAN, Douglas G., 1990. *Practical Statistics for Medical Research*. New York : Chapman and Hall/CRC. ISBN 978-0-429-25858-9.

ANAND, S. et MAYYA, Y. S., 2020. Size distribution of virus laden droplets from expiratory ejecta of infected subjects. *Scientific Reports*. décembre 2020. Vol. 10, n° 1, pp. 21174. DOI 10.1038/s41598-020-78110-x.

ANDERSEN, A. A., 1958. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of Bacteriology*. novembre 1958. Vol. 76, n° 5,

pp. 471-484. DOI 10.1128/jb.76.5.471-484.1958.

ANFINRUD, Philip, STADNYTSKYI, Valentyn, BAX, Christina E. et BAX, Adriaan, 2020. Visualizing Speech-Generated Oral Fluid Droplets with Laser Light Scattering. *The New England Journal of Medicine*. 21 mai 2020. Vol. 382, n° 21, pp. 2061-2063. DOI 10.1056/NEJMc2007800.

ANGEN, Oystein, THOMSEN, John, LARSEN, Lars Erik, LARSEN, Jesper, KOKOTOVIC, Branko, HEEGAARD, Peter M. H. et ENEMARK, Jörg M. D., 2009. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Veterinary Microbiology*. 28 mai 2009. Vol. 137, n° 1-2, pp. 165-171. DOI 10.1016/j.vetmic.2008.12.024.

BABIUK, L. A., LAWMAN, M. J. et OHMANN, H. B., 1988. Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. *Advances in Virus Research*. 1988. Vol. 35, pp. 219-249. DOI 10.1016/s0065-3527(08)60713-7.

BARBIERI, Pierluigi, ZUPIN, Luisa, LICEN, Sabina, TORBOLI, Valentina, SEMERARO, Sabrina, COZZUTTO, Sergio, PALMISANI, Jolanda, DI GILIO, Alessia, DE GENNARO, Gianluigi, FONTANA, Francesco, OMICIUOLO, Cinzia, PALLAVICINI, Alberto, RUSCIO, Maurizio et CROVELLA, Sergio, 2021. Molecular detection of SARS-CoV-2 from indoor air samples in environmental monitoring needs adequate temporal coverage and infectivity assessment. *Environmental Research*. juillet 2021. Vol. 198, pp. 111200. DOI 10.1016/j.envres.2021.111200.

BAREILLE, N, SEEGERS, H, DENIS, G, QUILLET, J M et ASSIE, S, 2008. Impact of respiratory disorders in young bulls during their fattening period on performance and profitability. . 2008.

BARTELS, Chris J. M., HOLZHAUER, Menno, JORRITSMA, Ruurd, SWART, Wim A. J. M. et LAM, Theo J. G. M., 2010. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*. 1 février 2010. Vol. 93, n° 2-3, pp. 162-169. DOI 10.1016/j.prevetmed.2009.09.020.

BASKERVILLE, A., 1981. Diagnostic methods in infectious respiratory disease. *New*
122 sur 157

Zealand Veterinary Journal. décembre 1981. Vol. 29, n° 12, pp. 239-241. DOI 10.1080/00480169.1981.34853.

BASU, Saptarshi, KABI, Prasenjit, CHAUDHURI, Swetaprovo et SAHA, Abhishek, 2020. Insights on drying and precipitation dynamics of respiratory droplets from the perspective of COVID-19. *Physics of Fluids*. 1 décembre 2020. Vol. 32, n° 12, pp. 123317. DOI 10.1063/5.0037360.

BAUDET, H.M., GRIERS, P., CHIEZE, C., ESPINASSE, J. et TRENTI, F., 1994. A clinical study of the microbiology in respiratory diseases of young cattle. In : *Proceedings of 18th World Buiatrics Congress*. Bologna, Italy. 1994. pp. 1359-1362.

BEAUDEAU, Francois, BJÖRKMAN, Camilla, ALENIUS, Stefan et FRÖSSLING, Jenny, 2010. Spatial patterns of bovine corona virus and bovine respiratory syncytial virus in the Swedish beef cattle population. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 21 mai 2010. Vol. 52, n° 1, pp. 33. DOI 10.1186/1751-0147-52-33.

BENFIELD, D A et SAIF, L J, 1990. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *Journal of Clinical Microbiology*. juin 1990. Vol. 28, n° 6, pp. 1454-1457.

BIDOKHTI, Mehdi R. M., TRÁVÉN, Madeleine, KRISHNA, Neel K., MUNIR, Muhammad, BELÁK, Sándor, ALENIUS, Stefan et CORTEY, Martí, 2013. Evolutionary dynamics of bovine coronaviruses: natural selection pattern of the spike gene implies adaptive evolution of the strains. *The Journal of General Virology*. septembre 2013. Vol. 94, n° Pt 9, pp. 2036-2049. DOI 10.1099/vir.0.054940-0.

BOILEAU, Mélanie J. et KAPIL, Sanjay, 2010. Bovine coronavirus associated syndromes. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. mars 2010. Vol. 26, n° 1, pp. 123-146, table of contents. DOI 10.1016/j.cvfa.2009.10.003.

BOK, M., MIÑO, S., RODRIGUEZ, D., BADARACCO, A., NUÑES, I., SOUZA, S. P., BILBAO, G., LOUGE URIARTE, E., GALARZA, R., VEGA, C., ODEON, A., SAIF, L. J. et PARREÑO, V., 2015. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994-2010. *Veterinary Microbiology*. 31 décembre 2015. Vol. 181, n° 3-4, pp. 221-229.

DOI 10.1016/j.vetmic.2015.10.017.

BOOKER, Calvin W., ABUTARBUSH, Sameeh M., MORLEY, Paul S., JIM, G. Kee, PITTMAN, Tom J., SCHUNICHT, Oliver C., PERRETT, Tye, WILDMAN, Brian K., FENTON, R. Kent, GUICHON, P. Timothy et JANZEN, Eugene D., 2008. Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in Western Canada. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*. mai 2008. Vol. 49, n° 5, pp. 473-481.

BOOTH, Timothy F., KOURNIKAKIS, Bill, BASTIEN, Nathalie, HO, Jim, KOBASA, Darwyn, STADNYK, Laurie, LI, Yan, SPENCE, Mel, PATON, Shirley, HENRY, Bonnie, MEDERSKI, Barbara, WHITE, Diane, LOW, Donald E., MCGEER, Allison, SIMOR, Andrew, VEARNCOMBE, Mary, DOWNEY, James, JAMIESON, Frances B., TANG, Patrick et PLUMMER, Frank, 2005. Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 mai 2005. Vol. 191, n° 9, pp. 1472-1477. DOI 10.1086/429634.

BORGES, João Tito, NAKADA, Liane Yuri Kondo, MANIERO, Milena Guedes et GUIMARÃES, José Roberto, 2021. SARS-CoV-2: a systematic review of indoor air sampling for virus detection. *Environmental Science and Pollution Research*. 1 août 2021. Vol. 28, n° 30, pp. 40460-40473. DOI 10.1007/s11356-021-13001-w.

BOURGUEIL, E., HUTET, E., CARIOLET, R. et VANNIER, P., 1992. Air sampling procedure for evaluation of viral excretion level by vaccinated pigs infected with Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Research in Veterinary Science*. mars 1992. Vol. 52, n° 2, pp. 182-186. DOI 10.1016/0034-5288(92)90008-p.

BOXUS, M., LETELLIER, C. et KERKHOF, P., 2005. Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*. mai 2005. Vol. 125, n° 2, pp. 125-130. DOI 10.1016/j.jviromet.2005.01.008.

BRESHEARS, Lane E., NGUYEN, Brandon T., MATA ROBLES, Samantha, WU, Lillian et YOON, Jeong-Yeol, 2022. Biosensor detection of airborne respiratory viruses such as SARS-CoV-2. *SLAS Technology*. février 2022. Vol. 27, n° 1, pp. 4-17. DOI 10.1016/j.slast.2021.12.004.

BRIAN, D. A. et BARIC, R. S., 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2005. Vol. 287, pp. 1-30. DOI 10.1007/3-540-26765-4_1.

BRYSON, D. G., 1985. Calf pneumonia. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. juillet 1985. Vol. 1, n° 2, pp. 237-257. DOI 10.1016/s0749-0720(15)31326-8.

BURIMUAH, Vitus, SYLVERKEN, Augustina, OWUSU, Michael, EL-DUAH, Philip, YEBOAH, Richmond, LAMPTEY, Jones, FRIMPONG, Yaw Oppong, AGBENYEGA, Olivia, FOLITSE, Raphael, EMIKPE, Ben, TASIAME, William, OWIREDU, Eddie-Williams, OPPONG, Samuel, ANTWI, Christopher, ADU-SARKODIE, Yaw et DROSTEN, Christian, 2020. Molecular-based cross-species evaluation of bovine coronavirus infection in cattle, sheep and goats in Ghana. *BMC Vet Res*. 2020. pp. 405-405.

BURTON, Nancy Clark, GRINSHPUN, Sergey A. et REPONEN, Tiina, 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *The Annals of Occupational Hygiene*. mars 2007. Vol. 51, n° 2, pp. 143-151. DOI 10.1093/annhyg/mel073.

CALDOW, George, 2001. Bronchoalveolar lavage in the investigation of bovine respiratory disease. *In Practice*. janvier 2001. Vol. 23, n° 1, pp. 41-43. DOI 10.1136/inpract.23.1.41.

CAPIK, Sarah F., WHITE, Brad J., LUBBERS, Brian V., APLEY, Michael D., DEDONDER, Keith D., LARSON, Robert L., HARHAY, Greg P., CHITKO-MCKOWN, Carol G., HARHAY, Dayna M., KALBFLEISCH, Ted S., SCHULLER, Gennie et CLAWSON, Michael L., 2017. Comparison of the diagnostic performance of bacterial culture of nasopharyngeal swab and bronchoalveolar lavage fluid samples obtained from calves with bovine respiratory disease. *American Journal of Veterinary Research*. mars 2017. Vol. 78, n° 3, pp. 350-358. DOI 10.2460/ajvr.78.3.350.

CHEN, Haoxuan et YAO, Maosheng, 2018. A high-flow portable biological aerosol trap (HighBioTrap) for rapid microbial detection. *Journal of Aerosol Science*. mars 2018. Vol. 117, pp. 212-223. DOI 10.1016/j.jaerosci.2017.11.012.

CHIA, Po Ying, COLEMAN, Kristen Kelli, TAN, Yian Kim, ONG, Sean Wei Xiang, GUM, Marcus, LAU, Sok Kiang, LIM, Xiao Fang, LIM, Ai Sim, SUTJIPTO, Stephanie, LEE, Pei Hua, SON, Than The, YOUNG, Barnaby Edward, MILTON, Donald K., GRAY, Gregory C., SCHUSTER, Stephan, BARKHAM, Timothy, DE, Partha Pratim, VASOO, Shawn, CHAN, Monica, ANG, Brenda Sze Peng, TAN, Boon Huan, LEO, Yee-Sin, NG, Oon-Tek, WONG, Michelle Su Yen, MARIMUTHU, Kalisvar, et SINGAPORE 2019 NOVEL CORONAVIRUS OUTBREAK RESEARCH TEAM, 2020. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nature Communications*. 29 mai 2020. Vol. 11, n° 1, pp. 2800. DOI 10.1038/s41467-020-16670-2.

CHO, K. O., HASOKSUZ, M., NIELSEN, P. R., CHANG, K. O., LATHROP, S. et SAIF, L. J., 2001. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Archives of Virology*. décembre 2001. Vol. 146, n° 12, pp. 2401-2419. DOI 10.1007/s007050170011.

CHO, K. O., HOET, A. E., LOERCH, S. C., WITTUM, T. E. et SAIF, L. J., 2001. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. *American Journal of Veterinary Research*. septembre 2001. Vol. 62, n° 9, pp. 1436-1441. DOI 10.2460/ajvr.2001.62.1436.

CHOI, Jeongan, HONG, Seung Chan, KIM, Woojin et JUNG, Jae Hee, 2017. Highly Enriched, Controllable, Continuous Aerosol Sampling Using Inertial Microfluidics and Its Application to Real-Time Detection of Airborne Bacteria. *ACS sensors*. 28 avril 2017. Vol. 2, n° 4, pp. 513-521. DOI 10.1021/acssensors.6b00753.

CHONG, Kai Leong, NG, Chong Shen, HORI, Naoki, YANG, Rui, VERZICCO, Roberto et LOHSE, Detlef, 2021. Extended lifetime of respiratory droplets in a turbulent vapour puff and its implications on airborne disease transmission. *Physical Review Letters*. 19 janvier 2021. Vol. 126, n° 3, pp. 034502. DOI 10.1103/PhysRevLett.126.034502.

CHOULJENKO, V. N., KOUSOULAS, K. G., LIN, X. et STORZ, J., 1998. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. *Virus Genes*. 1998. Vol. 17, n° 1, pp. 33-42.

DOI 10.1023/a:1008048916808.

CHUNG, Joon-Yee, KIM, Hye-Ryoung, BAE, You-Chan, LEE, O.-Soo et OEM, Jae-Ku, 2011. Detection and characterization of bovine-like coronaviruses from four species of zoo ruminants. *Veterinary Microbiology*. 24 mars 2011. Vol. 148, n° 2-4, pp. 396-401. DOI 10.1016/j.vetmic.2010.08.035.

CLARK, M. A., 1993. Bovine coronavirus. *British Veterinary Journal*. 1 janvier 1993. Vol. 149, n° 1, pp. 51-70. DOI 10.1016/S0007-1935(05)80210-6.

COLLINS, J. K., BUTCHER, A. C., TERAMOTO, Y. A. et WINSTON, S., 1985. Rapid detection of bovine herpesvirus type 1 antigens in nasal swab specimens with an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. mars 1985. Vol. 21, n° 3, pp. 375-380. DOI 10.1128/jcm.21.3.375-380.1985.

Coronaviridae, 2017. *Fenner's Veterinary Virology*. pp. 435-461. DOI 10.1016/B978-0-12-800946-8.00024-6.

CREIGHTON, SR et WILKINS, RJ, 1974. Transtracheal aspiration biopsy : technique and cytologic evaluation. *J. A .A .H .A*. 1974. Vol. 10, pp. 219-226.

CROUCH, C. F., OHMANN, H. B., WATTS, T. C. et BABIUK, L. A., 1985. Chronic Shedding of Bovine Enteric Coronavirus Antigen-Antibody Complexes by Clinically Normal Cows. *Journal of General Virology*. 1 juillet 1985. Vol. 66, n° 7, pp. 1489-1500. DOI 10.1099/0022-1317-66-7-1489.

DAGLEISH, M. P., FINLAYSON, J., BAYNE, C., MACDONALD, S., SALES, J. et HODGSON, J. C., 2010. Characterization and time course of pulmonary lesions in calves after intratracheal infection with *Pasteurella multocida* A:3. *Journal of Comparative Pathology*. 2010. Vol. 142, n° 2-3, pp. 157-169. DOI 10.1016/j.jcpa.2009.10.015.

DA SILVA, M. R., O'REILLY, K. L., LIN, X., STINE, L. et STORZ, J., 1999. Sensitivity comparison for detection of respiratory bovine coronaviruses in nasal samples from feedlot cattle by ELISA and isolation with the G clone of HRT-18 cells. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. janvier 1999. Vol. 11, n° 1, pp. 15-19.

DOI 10.1177/104063879901100102.

DECARO, Nicola, CAMPOLO, Marco, DESARIO, Costantina, CIRONE, Francesco, D'ABRAMO, Maria, LORUSSO, Eleonora, GRECO, Grazia, MARI, Viviana, COLAIANNI, Maria Loredana, ELIA, Gabriella, MARTELLA, Vito et BUONAVOGLIA, Canio, 2008. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* janvier 2008. Vol. 20, n° 1, pp. 28-32. DOI 10.1177/104063870802000105.

DECARO, Nicola, ELIA, Gabriella, CAMPOLO, Marco, DESARIO, Costantina, MARI, Viviana, RADOGNA, Arianna, COLAIANNI, Maria Loredana, CIRONE, Francesco, TEMPESTA, Maria et BUONAVOGLIA, Canio, 2008. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods.* août 2008. Vol. 151, n° 2, pp. 167-171. DOI 10.1016/j.jviromet.2008.05.016.

DEROSA, D. C., MECHOR, G. D., STAATS, J. J., CHENGAPPA, M. M. et SHRYOCK, T. R., 2000. Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology.* janvier 2000. Vol. 38, n° 1, pp. 327-332. DOI 10.1128/JCM.38.1.327-332.2000.

DOYLE, D., CREDILLE, B., LEHENBAUER, T. W., BERGHAUS, R., ALY, S. S., CHAMPAGNE, J., BLANCHARD, P., CROSSLEY, B., BERGHAUS, L., COCHRAN, S. et WOOLUMS, A., 2017. Agreement Among 4 Sampling Methods to Identify Respiratory Pathogens in Dairy Calves with Acute Bovine Respiratory Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* mai 2017. Vol. 31, n° 3, pp. 954-959. DOI 10.1111/jvim.14683.

DUFF, G. C. et GALYEAN, M. L., 2007. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *Journal of Animal Science.* 1 mars 2007. Vol. 85, n° 3, pp. 823-840. DOI 10.2527/jas.2006-501.

DUMONT-LEBLOND, Nathan, VEILLETTE, Marc, MUBAREKA, Samira, YIP, Lily, LONGTIN, Yves, JOUVET, Philippe, PAQUET BOLDUC, Bianka, GODBOUT, Stéphane, KOBINGER, Gary, MCGEER, Allison, MIKSZEWSKI, Alex et DUCHAINE,

Caroline, 2020. Low incidence of airborne SARS-CoV-2 in acute care hospital rooms with optimized ventilation. *Emerging Microbes & Infections*. 1 janvier 2020. Vol. 9, n° 1, pp. 2597-2605. DOI 10.1080/22221751.2020.1850184.

DYBWAD, Marius, SKOGAN, Gunnar et BLATNY, Janet Martha, 2014. Comparative Testing and Evaluation of Nine Different Air Samplers: End-to-End Sampling Efficiencies as Specific Performance Measurements for Bioaerosol Applications. *Aerosol Science and Technology*. 4 mars 2014. Vol. 48, n° 3, pp. 282-295. DOI 10.1080/02786826.2013.871501.

ELAZHARY, M. A., FRECHETTE, J. L., SILIM, A. et ROY, R. S., 1981. Serological evidence of some bovine viruses in the caribou (*Rangifer tarandus caribou*) in Quebec. *Journal of Wildlife Diseases*. octobre 1981. Vol. 17, n° 4, pp. 609-612. DOI 10.7589/0090-3558-17.4.609.

EL-KANAWATI, Z. R., TSUNEMITSU, H., SMITH, D. R. et SAIF, L. J., 1996. Infection and cross-protection studies of winter dysentery and calf diarrhea bovine coronavirus strains in colostrum-deprived and gnotobiotic calves. *American Journal of Veterinary Research*. janvier 1996. Vol. 57, n° 1, pp. 48-53.

ELLIS, John, 2019. What is the evidence that bovine coronavirus is a biologically significant respiratory pathogen in cattle? *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*. février 2019. Vol. 60, n° 2, pp. 147-152.

ELLIS, John, ERICKSON, Nathan, GOW, Sheryl, WEST, Keith, LACOSTE, Stacey et GODSON, Dale, 2020. Infection of calves with in-vivo passaged bovine parainfluenza-3 virus, alone or in combination with bovine respiratory syncytial virus and bovine coronavirus. *Canadian Journal of Veterinary Research*. juillet 2020. Vol. 84, n° 3, pp. 163-171.

ERLES, Kerstin, TOOMEY, Crista, BROOKS, Harriet W. et BROWNLIE, Joe, 2003. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*. 5 juin 2003. Vol. 310, n° 2, pp. 216-223. DOI 10.1016/s0042-6822(03)00160-0.

ERRINGTON, F. P. et POWELL, E. O., 1969. A cyclone separator for aerosol sampling

in the field. *The Journal of Hygiene*. septembre 1969. Vol. 67, n° 3, pp. 387-399. DOI 10.1017/s0022172400041802.

ESPINASSE, J., ALZIEU, J. P., PAPAGEORGIU, C., BEGUIN, J. C. et VAN GOOL, F., 1991. Use of transtracheal aspiration to identify pathogens in pneumonic calves. *The Veterinary Record*. 12 octobre 1991. Vol. 129, n° 15, pp. 339. DOI 10.1136/vr.129.15.339-a.

ESTOLA, T., 1970. Coronaviruses, a new group of animal RNA viruses. *Avian Diseases*. mai 1970. Vol. 14, n° 2, pp. 330-336.

FAHKRAJANG, Watcharapong, SUDARYATMA, Putu Eka, MEKATA, Hirohisa, HAMABE, Saori, SAITO, Akatsuki et OKABAYASHI, Tamaki, 2021. Bovine respiratory coronavirus enhances bacterial adherence by upregulating expression of cellular receptors on bovine respiratory epithelial cells. *Veterinary Microbiology*. avril 2021. Vol. 255, pp. 109017. DOI 10.1016/j.vetmic.2021.109017.

FALCY, C., MILLEMANN, Y., MAILLARD, R. et POLACK, B., 2003. Examens paracliniques en pathologie respiratoire. *Point Vet*. 2003. Vol. 34, n° numéro spécial, pp. 142-147.

FEDIDA, M., DANNACHER, G., PERRIN, M., MARTEL, J.L., MOUSSA, A. et PERRIN, B., 1985. Diagnostic de laboratoire des affections respiratoires des bovins (1). *Rec. Méd. Vét*. 1985. Vol. 161, pp. 1191-1202.

FEDORENKO, Aliza, GRINBERG, Maor, OREVI, Tomer et KASHTAN, Nadav, 2020. Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. *Scientific Reports*. décembre 2020. Vol. 10, n° 1, pp. 22419. DOI 10.1038/s41598-020-79625-z.

FOGARTY, U., 1990. Evaluation of a bronchoalveolar lavage technique. *Equine Veterinary Journal*. mai 1990. Vol. 22, n° 3, pp. 174-176. DOI 10.1111/j.2042-3306.1990.tb04241.x.

FORTIER, G., 1997. Pathologies respiratoires : Quel rôle pour le laboratoire ? *Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V. Vichy*. 21 mai 1997. pp. 67-72.

FRENZ, David A et LINCE, Naomi L, 1997. A Comparison of Pollen Recovery by Three Models of the Rotorod Sampler. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. septembre 1997. Vol. 79, n° 3, pp. 256-258. DOI 10.1016/S1081-1206(10)63011-6.

FRONCZEK, Christopher F. et YOON, Jeong-Yeol, 2015. Biosensors for Monitoring Airborne Pathogens. *SLAS Technology*. août 2015. Vol. 20, n° 4, pp. 390-410. DOI 10.1177/2211068215580935.

FULTON, Robert W., 2009. Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Animal Health Research Reviews*. décembre 2009. Vol. 10, n° 2, pp. 131-139. DOI 10.1017/S146625230999017X.

FULTON, Robert W., BLOOD, K. Shawn, PANCIERA, Roger J., PAYTON, Mark E., RIDPATH, Julia F., CONFER, Anthony W., SALIKI, Jeremiah T., BURGE, Lurinda T., WELSH, Ronald D., JOHNSON, Bill J. et RECK, Amy, 2009. Lung Pathology and Infectious Agents in Fatal Feedlot Pneumonias and Relationship with Mortality, Disease Onset, and Treatments. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. juillet 2009. Vol. 21, n° 4, pp. 464-477. DOI 10.1177/104063870902100407.

FULTON, Robert W. et CONFER, Anthony W., 2012. Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: gold standards for diagnosis, do they exist? *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*. juillet 2012. Vol. 53, n° 7, pp. 754-761.

FULTON, Robert W., STEP, Douglas L., WAHRMUND, Jackie, BURGE, Lurinda J., PAYTON, Mark E., COOK, Billy J., BURKEN, Dirk, RICHARDS, Chris J. et CONFER, Anthony W., 2011. Bovine coronavirus (BCV) infections in transported commingled beef cattle and sole-source ranch calves. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. juillet 2011. Vol. 75, n° 3, pp. 191-199.

FULTON, R.W., D'OFFAY, J.M., LANDIS, C., MILES, D.G., SMITH, R.A., SALIKI, J.T., RIDPATH, J.F., CONFER, A.W., NEILL, J.D., EBERLE, R., CLEMENT, T.J., CHASE, C.C.L., BURGE, L.J. et PAYTON, M.E., 2016. Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. *Vaccine*. juin 2016. Vol. 34, n° 30, pp. 3478-3492. DOI 10.1016/j.vaccine.2016.04.020.

GAGEA, Mihai I., BATEMAN, Kenneth G., VAN DREUMEL, Tony, MCEWEN, Beverly J., CARMAN, Susy, ARCHAMBAULT, Marie, SHANAHAN, Rachel A. et CASWELL, Jeff L., 2006. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* janvier 2006. Vol. 18, n° 1, pp. 18-28. DOI 10.1177/104063870601800104.

GE, Xing-Yi, PU, Ying, LIAO, Ce-Heng, HUANG, Wen-Fen, ZENG, Qi, ZHOU, Hui, YI, Bin, WANG, Ai-Min, DOU, Qing-Ya, ZHOU, Peng-Cheng, CHEN, Hui-Ling, LIU, Hui-Xia, XU, Dao-Miao, CHEN, Xiang et HUANG, Xun, 2020. Evaluation of the exposure risk of SARS-CoV-2 in different hospital environment. *Sustainable Cities and Society.* octobre 2020. Vol. 61, pp. 102413. DOI 10.1016/j.scs.2020.102413.

GODINHO, K. S., SARASOLA, P., RENOULT, E., TILT, N., KEANE, S., WINDSOR, G. D., ROWAN, T. G. et SUNDERLAND, S. J., 2007. Use of deep nasopharyngeal swabs as a predictive diagnostic method for natural respiratory infections in calves. *The Veterinary Record.* 6 janvier 2007. Vol. 160, n° 1, pp. 22-25. DOI 10.1136/vr.160.1.22.

GRALTON, Jan, TOVEY, Euan, MCLAWS, Mary-Louise et RAWLINSON, William D., 2011. The role of particle size in aerosolised pathogen transmission: A review. *Journal of Infection.* janvier 2011. Vol. 62, n° 1, pp. 1-13. DOI 10.1016/j.jinf.2010.11.010.

GRIFFIN, D., 1997. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* novembre 1997. Vol. 13, n° 3, pp. 367-377. DOI 10.1016/s0749-0720(15)30302-9.

GRIFFIN, Dee, CHENGAPPA, M. M., KUSZAK, Jennifer et MCVEY, D. Scott, 2010a. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* juillet 2010. Vol. 26, n° 2, pp. 381-394. DOI 10.1016/j.cvfa.2010.04.004.

GRIFFIN, Dee, CHENGAPPA, M. M., KUSZAK, Jennifer et MCVEY, D. Scott, 2010b. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* juillet 2010. Vol. 26, n° 2, pp. 381-394. DOI 10.1016/j.cvfa.2010.04.004.

GUHA, Suvajyoti, HARIHARAN, Prasanna et MYERS, Matthew, 2014. Enhancement of ICRP's Lung Deposition Model for Pathogenic Bioaerosols. *Aerosol Science and Technology*. 1 décembre 2014. Vol. 48. DOI 10.1080/02786826.2014.975334.

GULLIKSEN, S. M., JOR, E., LIE, K. I., LØKEN, T., AKERSTEDT, J. et ØSTERÅS, O., 2009. Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *Journal of Dairy Science*. octobre 2009. Vol. 92, n° 10, pp. 5139-5146. DOI 10.3168/jds.2009-2224.

HAN, Taewon T., MYERS, Nirmala T., MANIBUSAN, Sydonia et MAINELIS, Gediminas, 2022. Development and optimization of Stationary Electrostatic Bioaerosol Sampler (SEBS) for viable and culturable airborne microorganisms. *Journal of Aerosol Science*. mai 2022. Vol. 162, pp. 105951. DOI 10.1016/j.jaerosci.2022.105951.

HARRISON, R M et HESTER, R E (éd.), 2019. *Indoor Air Pollution* [en ligne]. The Royal Society of Chemistry. [Consulté le 27 septembre 2023]. ISBN 978-1-78801-514-1. Disponible à l'adresse : <https://books.rsc.org/books/book/825/Indoor-Air-Pollution>

HASOKSUZ, M., LATHROP, S., AL-DUBAIB, M. A., LEWIS, P. et SAIF, L. J., 1999. Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. *Archives of Virology*. 1999. Vol. 144, n° 12, pp. 2441-2447. DOI 10.1007/s007050050656.

HASOKSUZ, M., LATHROP, S. L., GADFIELD, K. L. et SAIF, L. J., 1999. Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. *American Journal of Veterinary Research*. octobre 1999. Vol. 60, n° 10, pp. 1227-1233.

HASOKSUZ, Mustafa, ALEKSEEV, Konstantin, VLASOVA, Anastasia, ZHANG, Xinsheng, SPIRO, David, HALPIN, Rebecca, WANG, Shiliang, GHEDIN, Elodie et SAIF, Linda J., 2007. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. *Journal of Virology*. mai 2007. Vol. 81, n° 10, pp. 4981-4990. DOI 10.1128/JVI.02361-06.

HASOKSUZ, Mustafa, HOET, Armando E., LOERCH, Steven C., WITTUM, Thomas E., NIELSEN, Paul R. et SAIF, Linda J., 2002. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *Journal of Veterinary*

Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. juillet 2002. Vol. 14, n° 4, pp. 308-313. DOI 10.1177/104063870201400406.

HEADLEY, Selwyn A., OKANO, Werner, BALBO, Luciana C., MARCASSO, Rogério A., OLIVEIRA, Thalita E., ALFIERI, Alice F., NEGRI FILHO, Luiz C., MICHELAZZO, Mariana Z., RODRIGUES, Silvio C., BAPTISTA, Anderson L., SAUT, João Paulo E. et ALFIERI, Amauri A., 2018. Molecular survey of infectious agents associated with bovine respiratory disease in a beef cattle feedlot in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* mars 2018. Vol. 30, n° 2, pp. 249-251. DOI 10.1177/1040638717739945.

HECKERT, R. A., SAIF, L. J., HOBLET, K. H. et AGNES, A. G., 1990. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. *Veterinary Microbiology.* avril 1990. Vol. 22, n° 2-3, pp. 187-201. DOI 10.1016/0378-1135(90)90106-6.

HECKERT, R. A., SAIF, L. J. et MYERS, G. W., 1989. Development of protein A-gold immunoelectron microscopy for detection of bovine coronavirus in calves: comparison with ELISA and direct immunofluorescence of nasal epithelial cells. *Veterinary Microbiology.* mars 1989. Vol. 19, n° 3, pp. 217-231. DOI 10.1016/0378-1135(89)90068-0.

HECKERT, R. A., SAIF, L. J., MYERS, G. W. et AGNES, A. G., 1991. Epidemiologic factors and isotype-specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. *American Journal of Veterinary Research.* juin 1991. Vol. 52, n° 6, pp. 845-851.

HICK, P. M., READ, A. J., LUGTON, I., BUSFIELD, F., DAWOOD, K. E., GABOR, L., HORNITZKY, M. et KIRKLAND, P. D., 2012. Coronavirus infection in intensively managed cattle with respiratory disease. *Australian Veterinary Journal.* octobre 2012. Vol. 90, n° 10, pp. 381-386. DOI 10.1111/j.1751-0813.2012.00978.x.

HINDS, William C. et ZHU, Yifang, 1998. *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles.* Third edition. Hoboken, NJ : Wiley. ISBN 978-1-

119-49406-5. QC882.42

HODNIK, Jaka Jakob, JEŽEK, Jožica et STARIČ, Jože, 2020. Coronaviruses in cattle. *Tropical Animal Health and Production*. novembre 2020. Vol. 52, n° 6, pp. 2809-2816. DOI 10.1007/s11250-020-02354-y.

HOFFMAN, A.M., VIEL, L., MUCKLE, C.A. et TESAROWSKI, D.B., 1990. Safe bronchoscopy: Use of a sheath to prevent contamination from the upper airways. *Am Rev Respiratory Disease*. 1990. Vol. 141, pp. 278.

HOLMAN, Devin B., MCALLISTER, Tim A., TOPP, Edward, WRIGHT, André-Denis G. et ALEXANDER, Trevor W., 2015. The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*. 22 octobre 2015. Vol. 180, n° 1-2, pp. 90-95. DOI 10.1016/j.vetmic.2015.07.031.

HONG, Seongkyeol, BHARDWAJ, Jyoti, HAN, Chang-Ho et JANG, Jaesung, 2016. Gentle Sampling of Submicrometer Airborne Virus Particles using a Personal Electrostatic Particle Concentrator. *Environmental Science & Technology*. 15 novembre 2016. Vol. 50, n° 22, pp. 12365-12372. DOI 10.1021/acs.est.6b03464.

HORVE, Patrick Finn, DIETZ, Leslie, NORTH CUTT, Dale, STENSON, Jason et VAN DEN WYMELENBERG, Kevin, 2021. Evaluation of a bioaerosol sampler for indoor environmental surveillance of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *PloS One*. 2021. Vol. 16, n° 11, pp. e0257689. DOI 10.1371/journal.pone.0257689.

HUSSAIN, K. A., STORZ, J. et KOUSOULAS, K. G., 1991. Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike glycoprotein distinguish between vaccine and wild-type strains. *Virology*. juillet 1991. Vol. 183, n° 1, pp. 442-445. DOI 10.1016/0042-6822(91)90163-6.

ISMAIL, M. M., CHO, K. O., WARD, L. A., SAIF, L. J. et SAIF, Y. M., 2001. Experimental bovine coronavirus in turkey poults and young chickens. *Avian Diseases*. 2001. Vol. 45, n° 1, pp. 157-163.

JANG, Junbeom, BHARDWAJ, Jyoti et JANG, Jaesung, 2022. Efficient measurement of airborne viable viruses using the growth-based virus aerosol concentrator with high flow velocities. *Journal of Hazardous Materials*. 15 juillet 2022. Vol. 434, pp. 128873.

DOI 10.1016/j.jhazmat.2022.128873.

JOHNSON, G.R., MORAWSKA, L., RISTOVSKI, Z.D., HARGREAVES, M., MENGERSEN, K., CHAO, C.Y.H., WAN, M.P., LI, Y., XIE, X., KATOSHEVSKI, D. et CORBETT, S., 2011. Modality of human expired aerosol size distributions. *Journal of Aerosol Science*. décembre 2011. Vol. 42, n° 12, pp. 839-851. DOI 10.1016/j.jaerosci.2011.07.009.

JOHNSTON, Dayle, EARLEY, Bernadette, CORMICAN, Paul, MURRAY, Gerard, KENNY, David Anthony, WATERS, Sinead Mary, MCGEE, Mark, KELLY, Alan Kieran et MCCABE, Matthew Sean, 2017. Illumina MiSeq 16S amplicon sequence analysis of bovine respiratory disease associated bacteria in lung and mediastinal lymph node tissue. *BMC veterinary research*. 2 mai 2017. Vol. 13, n° 1, pp. 118. DOI 10.1186/s12917-017-1035-2.

JONGES, Marcel, VAN LEUKEN, Jeroen, WOUTERS, Inge, KOCH, Guus, MEIJER, Adam et KOOPMANS, Marion, 2015. Wind-Mediated Spread of Low-Pathogenic Avian Influenza Virus into the Environment during Outbreaks at Commercial Poultry Farms. *PloS One*. 2015. Vol. 10, n° 5, pp. e0125401. DOI 10.1371/journal.pone.0125401.

JOULIÉ et HERMAN, 2023. Le LBA en pratique : comparaison avec les autres modes de prélèvement. *SNGTV* [en ligne]. 1 janvier 2023. [Consulté le 12 octobre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www2.sngtv.org/article-bulletin/le-lba-en-pratique-comparaison-avec-les-autres-modes-de-prelevement/>

KANESHIMA, Takashi, HOHDATSU, Tsutomu, HAGINO, Ryoko, HOSOYA, Sakiko, NOJIRI, Yui, MURATA, Michiko, TAKANO, Tomomi, TANABE, Maki, TSUNEMITSU, Hiroshi et KOYAMA, Hiroyuki, 2007. The infectivity and pathogenicity of a group 2 bovine coronavirus in pups. *The Journal of Veterinary Medical Science*. mars 2007. Vol. 69, n° 3, pp. 301-303. DOI 10.1292/jvms.69.301.

KANNO, Toru, HATAMA, Shinichi, ISHIHARA, Ryoko et UCHIDA, Ikuo, 2007. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *The Journal of General Virology*. avril 2007. Vol. 88, n° Pt 4, pp. 1218-1224. DOI 10.1099/vir.0.82635-0.

KAPIL, S. et BASARABA, R. J., 1997. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-

3, and respiratory coronavirus. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. novembre 1997. Vol. 13, n° 3, pp. 455-469. DOI 10.1016/s0749-0720(15)30308-x.

KAPIL, S., POMEROY, K. A., GOYAL, S. M. et TRENT, A. M., 1991. Experimental infection with a virulent pneumoenteric isolate of bovine coronavirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* janvier 1991. Vol. 3, n° 1, pp. 88-89. DOI 10.1177/104063879100300123.

KAPIL, Sanjay, TRENT, Ava M. et GOYAL, Sagar M., 1990. Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. *Archives of Virology*. mars 1990. Vol. 115, n° 1-2, pp. 127-132. DOI 10.1007/BF01310629.

KEHA, Abi, XUE, Luo, YAN, Shen, YUE, Hua et TANG, Cheng, 2019. Prevalence of a novel bovine coronavirus strain with a recombinant hemagglutinin/esterase gene in dairy calves in China. *Transboundary and Emerging Diseases*. septembre 2019. Vol. 66, n° 5, pp. 1971-1981. DOI 10.1111/tbed.13228.

KIM, Hyeong Rae, AN, Sangwon et HWANG, Jungho, 2020. An integrated system of air sampling and simultaneous enrichment for rapid biosensing of airborne coronavirus and influenza virus. *Biosensors & Bioelectronics*. 15 décembre 2020. Vol. 170, pp. 112656. DOI 10.1016/j.bios.2020.112656.

KIM, J. H., JANG, J.-H., YOON, S.-W., NOH, J. Y., AHN, M.-J., KIM, Y., JEONG, D. G. et KIM, H. K., 2018. Detection of bovine coronavirus in nasal swab of non-captive wild water deer, Korea. *Transboundary and Emerging Diseases*. juin 2018. Vol. 65, n° 3, pp. 627-631. DOI 10.1111/tbed.12847.

KING, Andrew M. Q., ADAMS, Michael J., CARSTENS, Eric B. et LEFKOWITZ, Elliot J. (éd.), 2012. Family - Coronaviridae. In : , *Virus Taxonomy* [en ligne]. San Diego : Elsevier. pp. 806-828. [Consulté le 5 juillet 2023]. ISBN 978-0-12-384684-6. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000689>

KLIMA, Cassidy L., HOLMAN, Devin B., RALSTON, Brenda J., STANFORD, Kim,

ZAHEER, Rahat, ALEXANDER, Trevor W. et MCALLISTER, Tim A., 2019. Lower Respiratory Tract Microbiome and Resistome of Bovine Respiratory Disease Mortalities. *Microbial Ecology*. août 2019. Vol. 78, n° 2, pp. 446-456. DOI 10.1007/s00248-019-01361-3.

LADHANI, Laila, PARDON, Gaspard, MEEUWS, Hanne, VAN WESENBEECK, Liesbeth, SCHMIDT, Kristiane, STUYVER, Lieven et VAN DER WIJNGAART, Wouter, 2017. Sampling and detection of airborne influenza virus towards point-of-care applications. HARROD, Kevin (éd.), *PLOS ONE*. 28 mars 2017. Vol. 12, n° 3, pp. e0174314. DOI 10.1371/journal.pone.0174314.

LANE, Morgan A., BROWNSWORD, Erik A., MORGAN, Jill S., BABIKER, Ahmed, VANAIRSDALE, Sharon A., LYON, G. Marshall, MEHTA, Aneesh K., INGERSOLL, Jess M., LINDSLEY, William G. et KRAFT, Colleen S., 2020. Bioaerosol sampling of a ventilated patient with COVID-19. *American Journal of Infection Control*. décembre 2020. Vol. 48, n° 12, pp. 1540-1542. DOI 10.1016/j.ajic.2020.07.033.

LAPPS, W., HOGUE, B. G. et BRIAN, D. A., 1987. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology*. mars 1987. Vol. 157, n° 1, pp. 47-57. DOI 10.1016/0042-6822(87)90312-6.

LARSEN, L. E., TJØRNEHØJ, K., VIUFF, B., JENSEN, N. E. et UTTENTHAL, A., 1999. Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* septembre 1999. Vol. 11, n° 5, pp. 416-422. DOI 10.1177/104063879901100505.

LARSSON, B., OLIVECRONA, G. et ERICSON, T., 1996. Lipids in human saliva. *Archives of Oral Biology*. janvier 1996. Vol. 41, n° 1, pp. 105-110. DOI 10.1016/0003-9969(95)00077-1.

LATHROP, S. L., WITTUM, T. E., BROCK, K. V., LOERCH, S. C., PERINO, L. J., BINGHAM, H. R., MCCOLLUM, F. T. et SAIF, L. J., 2000. Association between infection of the respiratory tract attributable to bovine coronavirus and health and

growth performance of cattle in feedlots. *American Journal of Veterinary Research*. septembre 2000. Vol. 61, n° 9, pp. 1062-1066. DOI 10.2460/ajvr.2000.61.1062.

LATHROP, S. L., WITTUM, T. E., LOERCH, S. C., PERINO, L. J. et SAIF, L. J., 2000. Antibody titers against bovine coronavirus and shedding of the virus via the respiratory tract in feedlot cattle. *American Journal of Veterinary Research*. septembre 2000. Vol. 61, n° 9, pp. 1057-1061. DOI 10.2460/ajvr.2000.61.1057.

LEE, Inae, SEOK, Youngung, JUNG, Huijin, YANG, Byungjin, LEE, Jiho, KIM, Jaeyoung, PYO, Heesoo, SONG, Chang-Seon, CHOI, Won, KIM, Min-Gon et LEE, Joonseok, 2020. Integrated Bioaerosol Sampling/Monitoring Platform: Field-Deployable and Rapid Detection of Airborne Viruses. *ACS Sensors*. 24 décembre 2020. Vol. 5, n° 12, pp. 3915-3922. DOI 10.1021/acssensors.0c01531.

LEHENBAUER, Terry W., 2014. Control of BRD in large dairy calf populations. *Animal Health Research Reviews*. décembre 2014. Vol. 15, n° 2, pp. 184-185. DOI 10.1017/S146625231400022X.

LIEBER, Christian, MELEKIDIS, Stefanos, KOCH, Rainer et BAUER, Hans-Jörg, 2021. Insights into the evaporation characteristics of saliva droplets and aerosols: Levitation experiments and numerical modeling. *Journal of Aerosol Science*. mai 2021. Vol. 154, pp. 105760. DOI 10.1016/j.jaerosci.2021.105760.

LIN, Kaisen, SCHULTE, Chase R. et MARR, Linsey C., 2020. Survival of MS2 and Φ 6 viruses in droplets as a function of relative humidity, pH, and salt, protein, and surfactant concentrations. ALMEIDA, Adelaide (éd.), *PLOS ONE*. 8 décembre 2020. Vol. 15, n° 12, pp. e0243505. DOI 10.1371/journal.pone.0243505.

LIN, X., O'REILLY, K. L., BURRELL, M. L. et STORZ, J., 2001. Infectivity-neutralizing and hemagglutinin-inhibiting antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle in pathogenesis of shipping fever pneumonia. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. mars 2001. Vol. 8, n° 2, pp. 357-362. DOI 10.1128/CDLI.8.2.357-362.2001.

LINDSLEY, William G, GREEN, Brett J, BLACHERE, Françoise M, MARTIN, Stephen B, JENSEN, Paul A et SCHAFER, Millie P, 2017. Sampling and characterization of bioaerosols. . 2017.

LIU, Yuan, NING, Zhi, CHEN, Yu, GUO, Ming, LIU, Yingle, GALI, Nirmal Kumar, SUN, Li, DUAN, Yusen, CAI, Jing, WESTERDAHL, Dane, LIU, Xinjin, HO, Kin-fai, KAN, Haidong, FU, Qingyan et LAN, Ke, 2020. *Aerodynamic Characteristics and RNA Concentration of SARS-CoV-2 Aerosol in Wuhan Hospitals during COVID-19 Outbreak* [en ligne]. preprint. Microbiology. [Consulté le 25 juillet 2023]. Disponible à l'adresse : <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.03.08.982637>

LIYUAN, Zhang, GU, Zhaolin, YU, Chuck, ZHANG, Yunwei et CHENG, Yan, 2016. Surface charges on aerosol particles - Accelerating particle growth rate and atmospheric pollution. *Indoor and Built Environment*. 1 mai 2016. Vol. 25, pp. 437-440. DOI 10.1177/1420326X16643799.

MAILLARD, R. et DOUART, A., 2003. Examens complémentaires possibles en pathologie respiratoire bovine. *Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V. Nantes*. mai 2003. pp. 91-94.

MAJHDI, F., MINOCHA, H. C. et KAPIL, S., 1997. Isolation and characterization of a coronavirus from elk calves with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. novembre 1997. Vol. 35, n° 11, pp. 2937-2942. DOI 10.1128/jcm.35.11.2937-2942.1997.

MARK, D. et VINCENT, J. H., 1986. A new personal sampler for airborne total dust in workplaces. *The Annals of Occupational Hygiene*. 1986. Vol. 30, n° 1, pp. 89-102. DOI 10.1093/annhyg/30.1.89.

MARS, M. H, BRUSCHKE, C. J. M et VAN OIRSCHOT, J. T, 1999. Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Veterinary Microbiology*. 13 avril 1999. Vol. 66, n° 3, pp. 197-207. DOI 10.1016/S0378-1135(99)00009-7.

MARTIN, S. W., NAGY, E., SHEWEN, P. E. et HARLAND, R. J., 1998. The association of titers to bovine coronavirus with treatment for bovine respiratory disease and weight gain in feedlot calves. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. octobre 1998. Vol. 62, n° 4, pp. 257-261.

MAY, K. R. et HARPER, G. J., 1957. The efficiency of various liquid impinger samplers in bacterial aerosols. *British Journal of Industrial Medicine*. octobre 1957. Vol. 14, n° 4,

pp. 287-297. DOI 10.1136/oem.14.4.287.

MCCLUSKEY, R., SANDIN, R. et GREENE, J., 1996. Detection of airborne cytomegalovirus in hospital rooms of immunocompromised patients. *Journal of Virological Methods*. janvier 1996. Vol. 56, n° 1, pp. 115-118. DOI 10.1016/0166-0934(95)01955-3.

MCDANELD, Tara G., KUEHN, Larry A. et KEELE, John W., 2018. Evaluating the microbiome of two sampling locations in the nasal cavity of cattle with bovine respiratory disease complex (BRDC). *Journal of Animal Science*. 12 avril 2018. Vol. 96, n° 4, pp. 1281-1287. DOI 10.1093/jas/sky032.

MCLAUGHLIN, R.W. et MISKE, F.R., 1980. A Technique for bronchial aspiration in the calf. *Bovine Practice*. 1980. Vol. 6, pp. 29-31.

MCNULTY, M.S., BRYSON, D.G., ALLAN, G.M. et LOGAN, E.F., 1984. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Veterinary Microbiology*. septembre 1984. Vol. 9, n° 5, pp. 425-434. DOI 10.1016/0378-1135(84)90063-4.

MEBUS, C. A., STAIR, E. L., RHODES, M. B. et TWIEHAUS, M. J., 1973. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *American Journal of Veterinary Research*. février 1973. Vol. 34, n° 2, pp. 145-150.

MEBUS, C. A., WHITE, R. G., STAIR, E. L., RHODES, M. B. et TWIEHAUS, M. J., 1972. Neonatal calf diarrhea: results of a field trial using a reo-like virus vaccine. *Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC*. février 1972. Vol. 67, n° 2, pp. 173- 174 passim.

MEIKLEJOHN, G., KEMPE, C. H., DOWNIE, A. W., BERGE, T. O., ST VINCENT, L. et RAO, A. R., 1961. Air sampling to recover variola virus in the environment of a smallpox hospital. *Bulletin of the World Health Organization*. 1961. Vol. 25, n° 1, pp. 63-67.

MERHI, Tania, ATASI, Omer, COETSIER, Clémence, LALANNE, Benjamin et ROGER, Kevin, 2022. Assessing suspension and infectivity times of virus-loaded aerosols involved in airborne transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 9 août 2022. Vol. 119, n° 32, pp. e2204593119.

DOI 10.1073/pnas.2204593119.

MOHAN, Suraj, PASCUAL-GARRIGOS, Ana, BROUWER, Haley, PILLAI, Deepti, KOZIOL, Jennifer, AULT, Aaron, SCHOONMAKER, Jon, JOHNSON, Timothy et VERMA, Mohit S., 2021. Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Histophilus somni* in Bovine Nasal Samples. *ACS Agricultural Science & Technology*. 19 avril 2021. Vol. 1, n° 2, pp. 100-108. DOI 10.1021/acsagscitech.0c00072.

MORRIS, Dylan H., YINDA, Kwe Claude, GAMBLE, Amandine, ROSSINE, Fernando W., HUANG, Qishen, BUSHMAKER, Trenton, FISCHER, Robert J., MATSON, M. Jeremiah, VAN DOREMALEN, Neeltje, VIKESLAND, Peter J., MARR, Linsey C., MUNSTER, Vincent J. et LLOYD-SMITH, James O., 2021. Mechanistic theory predicts the effects of temperature and humidity on inactivation of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses. *eLife*. 13 juillet 2021. Vol. 10, pp. e65902. DOI 10.7554/eLife.65902.

MOSIER, Derek, 2015. Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Animal Health Research Reviews*. décembre 2015. Vol. 15, n° 2, pp. 166-168. DOI 10.1017/S1466252314000176.

MYATT, Theodore A., JOHNSTON, Sebastian L., ZUO, Zhengfa, WAND, Matthew, KEBADZE, Tatiana, RUDNICK, Stephen et MILTON, Donald K., 2004. Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1 juin 2004. Vol. 169, n° 11, pp. 1187-1190. DOI 10.1164/rccm.200306-760OC.

MYTZKA, Nicolas, ARBACIAUSKAITE, Skaiste, SANDETSKAYA, Natalia, MATTERN, Kai et KUHLMIEIER, Dirk, 2023. A fully integrated duplex RT-LAMP device for the detection of viral infections. *Biomedical Microdevices*. 8 septembre 2023. Vol. 25, n° 4, pp. 36. DOI 10.1007/s10544-023-00676-w.

NAVETAT, H., 1995. A propos...L'aspiration transtrachéale chez les bovins. *Point Vét.* 1995. Vol. 166, pp. 90.

NETZ, Roland R., 2020. Mechanisms of Airborne Infection via Evaporating and Sedimenting Droplets Produced by Speaking. *The Journal of Physical Chemistry B*. 20

août 2020. Vol. 124, n° 33, pp. 7093-7101. DOI 10.1021/acs.jpcc.0c05229.

NETZ, Roland R. et EATON, William A., 2020. Physics of virus transmission by speaking droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 13 octobre 2020. Vol. 117, n° 41, pp. 25209-25211. DOI 10.1073/pnas.2011889117.

NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N. et HASE, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 15 juin 2000. Vol. 28, n° 12, pp. E63. DOI 10.1093/nar/28.12.e63.

OATES, J. K., SELWYN, S. et BREACH, M. R., 1971. Polyester sponge swabs to facilitate examination for genital infection in women. *The British Journal of Venereal Diseases*. août 1971. Vol. 47, n° 4, pp. 289-292. DOI 10.1136/sti.47.4.289.

OMA, Veslemøy Sunniva, TRÅVÉN, Madeleine, ALENIUS, Stefan, MYRMEL, Mette et STOKSTAD, Maria, 2016. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. *Virology Journal*. décembre 2016. Vol. 13, n° 1, pp. 100. DOI 10.1186/s12985-016-0555-x.

O'NEILL, R., MOONEY, J., CONNAGHAN, E., FURPHY, C. et GRAHAM, D. A., 2014. Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *Veterinary Record*. octobre 2014. Vol. 175, n° 14, pp. 351-351. DOI 10.1136/vr.102574.

OSWIN, Henry P., HADDRELL, Allen E., OTERO-FERNANDEZ, Mara, MANN, Jamie F. S., COGAN, Tristan A., HILDITCH, Thomas G., TIAN, Jianghan, HARDY, Daniel A., HILL, Darryl J., FINN, Adam, DAVIDSON, Andrew D. et REID, Jonathan P., 2022. The dynamics of SARS-CoV-2 infectivity with changes in aerosol microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 5 juillet 2022. Vol. 119, n° 27, pp. e2200109119. DOI 10.1073/pnas.2200109119.

PAN, M., LEDNICKY, J. A. et WU, C.-Y., 2019. Collection, particle sizing and detection of airborne viruses. *Journal of Applied Microbiology*. décembre 2019. Vol. 127, n° 6, pp. 1596-1611. DOI 10.1111/jam.14278.

PANSRI, P., KATHOLM, J., KROGH, K. M., AAGAARD, A. K., SCHMIDT, L. M. B., KUDIRKIENE, E., LARSEN, L. E. et OLSEN, J. E., 2020. Evaluation of novel multiplex

qPCR assays for diagnosis of pathogens associated with the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. février 2020. Vol. 256, pp. 105425. DOI 10.1016/j.tvjl.2020.105425.

PARDON, Bart, HOSTENS, Miel, DUCHATEAU, Luc, DEWULF, Jeroen, DE BLEECKER, Koen et DEPREZ, Piet, 2013. Impact of respiratory disease, diarrhea, otitis and arthritis on mortality and carcass traits in white veal calves. *BMC veterinary research*. 15 avril 2013. Vol. 9, pp. 79. DOI 10.1186/1746-6148-9-79.

PARDON, Gaspard, LADHANI, Laila, SANDSTRÖM, Niklas, ETTORI, Maxime, LOBOV, Gleb et VAN DER WIJNGAART, Wouter, 2015. Aerosol sampling using an electrostatic precipitator integrated with a microfluidic interface. *Sensors and Actuators B: Chemical*. juin 2015. Vol. 212, pp. 344-352. DOI 10.1016/j.snb.2015.02.008.

PARK, S. J., KIM, G. Y., CHOY, H. E., HONG, Y. J., SAIF, L. J., JEONG, J. H., PARK, S. I., KIM, H. H., KIM, S. K., SHIN, S. S., KANG, M. I. et CHO, K. O., 2007. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Archives of Virology*. 2007. Vol. 152, n° 10, pp. 1885-1900. DOI 10.1007/s00705-007-1005-2.

PASCUAL-GARRIGOS, Ana, MARUTHAMUTHU, Murali Kannan, AULT, Aaron, DAVIDSON, Josiah Levi, RUDAKOV, Grigorii, PILLAI, Deepti, KOZIOL, Jennifer, SCHOONMAKER, Jon P., JOHNSON, Timothy et VERMA, Mohit S., 2021. On-farm colorimetric detection of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Histophilus somni* in crude bovine nasal samples. *Veterinary Research*. 2 octobre 2021. Vol. 52, n° 1, pp. 126. DOI 10.1186/s13567-021-00997-9.

PEASE, Leonard F., WANG, Na, KULKARNI, Gourihar R., FLAHERTY, Julia E. et BURNS, Carolyn A., 2022. A missing layer in COVID-19 studies: Transmission of enveloped viruses in mucus-rich droplets. *International Communications in Heat and Mass Transfer*. février 2022. Vol. 131, pp. 105746. DOI 10.1016/j.icheatmasstransfer.2021.105746.

PHILLIPS, C. A. et GRIM, C. A., 1965. COMPARISON OF THE ELUTION AND ADSORPTION OF PICORNAVIRUSES BY COTTON AND CALCIUM ALGINATE WOOL SWABS. *Applied Microbiology*. mai 1965. Vol. 13, n° 3, pp. 457-459. DOI 10.1128/am.13.3.457-459.1965.

PIC, Stéphane, 2006. *Aspiration transtrachéale chez les bovins, réalisation et interprétation*. S.l. : s.n. A-2006-125

PIRI, Amin, KIM, Hyeong Rae, PARK, Dae Hoon et HWANG, Jungho, 2021. Increased survivability of coronavirus and H1N1 influenza virus under electrostatic aerosol-to-hydrosol sampling. *Journal of Hazardous Materials*. 5 juillet 2021. Vol. 413, pp. 125417. DOI 10.1016/j.jhazmat.2021.125417.

PLUMMER, Paul J., ROHRBACH, Barton W., DAUGHERTY, Richard A., DAUGHERTY, R. Andrew, THOMAS, Kathy V., WILKES, Rebecca P., DUGGAN, Florence E. et KENNEDY, Melissa A., 2004. Effect of intranasal vaccination against bovine enteric coronavirus on the occurrence of respiratory tract disease in a commercial backgrounding feedlot. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 septembre 2004. Vol. 225, n° 5, pp. 726-731. DOI 10.2460/javma.2004.225.726.

POHJANVIRTA, Tarja, VÄHÄNIKKILÄ, Nella, TALVITIE, Vera, PELKONEN, Sinikka et AUTIO, Tiina, 2021. Suitability of Nasal and Deep Nasopharyngeal Swab Sampling of Calves in the Mycoplasma bovis Control Program. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021. Vol. 8, pp. 689212. DOI 10.3389/fvets.2021.689212.

PRINGLE, J. K., VIEL, L., SHEWEN, P. E., WILLOUGHBY, R. A., MARTIN, S. W. et VALLI, V. E., 1988. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves: cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. avril 1988. Vol. 52, n° 2, pp. 239-248.

QIAO, Jun, MENG, Qingling, CAI, Xuepeng, CHEN, Chuangfu, ZHANG, Zaichao et TIAN, Zhenzhong, 2012. Rapid detection of *Betacoronavirus 1* from clinical fecal specimens by a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. janvier 2012. Vol. 24, n° 1, pp. 174-177. DOI 10.1177/1040638711425937.

RATNESAR-SHUMATE, Shanna, BOHANNON, Kyle, WILLIAMS, Gregory, HOLLAND, Brian, KRAUSE, Melissa, GREEN, Brian, FREEBURGER, Denise et DABISCH, Paul, 2021. Comparison of the performance of aerosol sampling devices

for measuring infectious SARS-CoV-2 aerosols. *Aerosol Science and Technology*. 22 juin 2021. Vol. 55, n° 8, pp. 975-986. DOI 10.1080/02786826.2021.1910137.

RAZZINI, Katia, CASTRICA, Marta, MENCHETTI, Laura, MAGGI, Lorenzo, NEGRONI, Lucia, ORFEO, Nicola V., PIZZOCCHERI, Alice, STOCCO, Matteo, MUTTINI, Stefano et BALZARETTI, Claudia M., 2020. SARS-CoV-2 RNA detection in the air and on surfaces in the COVID-19 ward of a hospital in Milan, Italy. *Science of The Total Environment*. novembre 2020. Vol. 742, pp. 140540. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.140540.

REYNOLDS, D. J., 1983. Coronavirus replication in the intestinal and respiratory tracts during infection of calves. *Annales De Recherches Veterinaires. Annals of Veterinary Research*. 1983. Vol. 14, n° 4, pp. 445-446.

REYNOLDS, D. J., DEBNEY, T. G., HALL, G. A., THOMAS, L. H. et PARSONS, K. R., 1985. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. *Archives of Virology*. 1985. Vol. 85, n° 1-2, pp. 71-83. DOI 10.1007/BF01317007.

REZAEI, Majid et NETZ, Roland R., 2021a. Airborne virus transmission via respiratory droplets: Effects of droplet evaporation and sedimentation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. octobre 2021. Vol. 55, pp. 101471. DOI 10.1016/j.cocis.2021.101471.

REZAEI, Majid et NETZ, Roland R., 2021b. Water evaporation from solute-containing aerosol droplets: Effects of internal concentration and diffusivity profiles and onset of crust formation. *Physics of Fluids (Woodbury, N.Y.: 1994)*. septembre 2021. Vol. 33, n° 9, pp. 091901. DOI 10.1063/5.0060080.

RODRÍGUEZ, María, PALOP, M. Llanos, SESEÑA, Susana et RODRÍGUEZ, Ana, 2021. Are the Portable Air Cleaners (PAC) really effective to terminate airborne SARS-CoV-2? *Science of The Total Environment*. septembre 2021. Vol. 785, pp. 147300. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.147300.

RODRÍGUEZ-HAKIM, Mariana, RÄZ, Linard et VERMANT, Jan, 2022. Variations in human saliva viscoelasticity affect aerosolization propensity. *Soft Matter*. 30 mars 2022. Vol. 18, n° 13, pp. 2528-2540. DOI 10.1039/d1sm01581h.

ROUX, Jean-Maxime, SARDA-ESTÈVE, R., DELAPIERRE, G, NADAL, M, BOSSUET, C et OLMEDO, L, 2016. Development of a new portable air sampler based on electrostatic precipitation. *Environmental science and pollution research international*. 1 mai 2016. Vol. 23. DOI 10.1007/s11356-015-5522-3.

ROUX, Jean-Maxime, SARDA-ESTÈVE, R., SCIARE, J., NADAL, M et DELAPIERRE, G, 2014. DEVELOPMENT OF A SILENT AND PORTABLE AIR SAMPLER SUITABLE FOR NANOPARTICLES. In : . 25 septembre 2014.

SAIF, L. J., 1990. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? *The Cornell Veterinarian*. octobre 1990. Vol. 80, n° 4, pp. 303-311.

SAIF, L. J., REDMAN, D. R., MOORHEAD, P. D. et THEIL, K. W., 1986. Experimentally induced coronavirus infections in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *American Journal of Veterinary Research*. juillet 1986. Vol. 47, n° 7, pp. 1426-1432.

SAIF, Linda J., 2010a. Bovine Respiratory Coronavirus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. juillet 2010. Vol. 26, n° 2, pp. 349-364. DOI 10.1016/j.cvfa.2010.04.005.

SAIF, Linda J., 2010b. Bovine Respiratory Coronavirus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. juillet 2010. Vol. 26, n° 2, pp. 349-364. DOI 10.1016/j.cvfa.2010.04.005.

SAIF, Linda J., HECKERT, Robert A., MILLER, Kathy L. et TAREK, Mohamed M., 1988. Cell culture propagation of bovine coronavirus. *Journal of Tissue Culture Methods: Tissue Culture Association Manual of Cell, Tissue, and Organ Culture Procedures*. 1988. Vol. 11, n° 3, pp. 139-145. DOI 10.1007/BF01404267.

SALEM, Elias, DHANASEKARAN, Vijaykrishna, CASSARD, Herve, HAUSE, Ben, MAMAN, Sarah, MEYER, Gilles et DUCATEZ, Mariette F., 2020. Global Transmission, Spatial Segregation, and Recombination Determine the Long-Term Evolution and Epidemiology of Bovine Coronaviruses. *Viruses*. 13 mai 2020. Vol. 12, n° 5, pp. 534. DOI 10.3390/v12050534.

SAWYER, M. H., CHAMBERLIN, C. J., WU, Y. N., AINTABLIAN, N. et WALLACE, M. R., 1994. Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *The Journal of Infectious Diseases*. janvier 1994. Vol. 169, n° 1, pp. 91-94. DOI 10.1093/infdis/169.1.91.

SCHELCHER, F., NAVETAT, H., LUET, P., BAROUX, D., THIESE, I. et VALACHER, JF, 1992. Examens de laboratoire dans les affections respiratoires et intestinales diarrhéiques des bovins. *Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* 24 novembre 1992. pp. 133-153.

SCHNEYER, L. H., YOUNG, J. A. et SCHNEYER, C. A., 1972. Salivary secretion of electrolytes. *Physiological Reviews*. juillet 1972. Vol. 52, n° 3, pp. 720-777. DOI 10.1152/physrev.1972.52.3.720.

SCHULTZE, B., GROSS, H. J., BROSSMER, R. et HERRLER, G., 1991. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *Journal of Virology*. novembre 1991. Vol. 65, n° 11, pp. 6232-6237. DOI 10.1128/JVI.65.11.6232-6237.1991.

SCHULTZE, B. et HERRLER, G., 1992. Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *The Journal of General Virology*. avril 1992. Vol. 73 (Pt 4), pp. 901-906. DOI 10.1099/0022-1317-73-4-901.

SCHULTZE, B. et HERRLER, G., 1994. Recognition of cellular receptors by bovine coronavirus. *Archives of Virology. Supplementum*. 1994. Vol. 9, pp. 451-459. DOI 10.1007/978-3-7091-9326-6_44.

SMITH, D. R., TSUNEMITSU, H., HECKERT, R. A. et SAIF, L. J., 1996. Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of bovine coronavirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* janvier 1996. Vol. 8, n° 1, pp. 99-105. DOI 10.1177/104063879600800116.

SNOWDER, G. D., VAN VLECK, L. D., CUNDIFF, L. V. et BENNETT, G. L., 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic

factors. *Journal of Animal Science*. août 2006. Vol. 84, n° 8, pp. 1999-2008. DOI 10.2527/jas.2006-046.

SOULES, Katelyn R., RAHE, Michael C., PURTLE, Lisa, MOECKLY, Craig, STARK, Paul, SAMSON, Clay et KNITTEL, Jeffrey P., 2022. Bovine Coronavirus Infects the Respiratory Tract of Cattle Challenged Intranasally. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022. Vol. 9, pp. 878240. DOI 10.3389/fvets.2022.878240.

STADNYTSKYI, Valentyn, BAX, Christina E., BAX, Adriaan et ANFINRUD, Philip, 2020. The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2 juin 2020. Vol. 117, n° 22, pp. 11875-11877. DOI 10.1073/pnas.2006874117.

STERN, Rebecca A., AL-HEMOUD, Ali, ALAHMAD, Barrak et KOUTRAKIS, Petros, 2021. Levels and particle size distribution of airborne SARS-CoV-2 at a healthcare facility in Kuwait. *Science of The Total Environment*. août 2021. Vol. 782, pp. 146799. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.146799.

STERN, Rebecca A., KOUTRAKIS, Petros, MARTINS, Marco A. G., LEMOS, Bernardo, DOWD, Scot E., SUNDERLAND, Elsie M. et GARSHICK, Eric, 2021. Characterization of hospital airborne SARS-CoV-2. *Respiratory Research*. décembre 2021. Vol. 22, n° 1, pp. 73. DOI 10.1186/s12931-021-01637-8.

STORZ, J., LIN, X., PURDY, C. W., CHOULJENKO, V. N., KOUSOULAS, K. G., ENRIGHT, F. M., GILMORE, W. C., BRIGGS, R. E. et LOAN, R. W., 2000. Coronavirus and Pasteurella infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *Journal of Clinical Microbiology*. septembre 2000. Vol. 38, n° 9, pp. 3291-3298. DOI 10.1128/JCM.38.9.3291-3298.2000.

STORZ, J., PURDY, C. W., LIN, X., BURRELL, M., TRUAX, R. E., BRIGGS, R. E., FRANK, G. H. et LOAN, R. W., 2000. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytocidal viruses, and Pasteurella spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15 mai 2000. Vol. 216, n° 10, pp. 1599-1604. DOI 10.2460/javma.2000.216.1599.

STORZ, J., STINE, L., LIEM, A. et ANDERSON, G. A., 1996. Coronavirus isolation

from nasal swab samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1996. Vol. 208, n° 9, pp. 1452-1455.

STRAUB, O. C., 1995. Viral respiratory infections of cattle. *The Bovine Practitioner*. 1 septembre 1995. pp. 66-70. DOI 10.21423/bovine-vol1995no29p66-70.

SU, Xiaodi, SUTARLIE, Laura et LOH, Xian Jun, 2020. Sensors and Analytical Technologies for Air Quality: Particulate Matters and Bioaerosols. *Chemistry, an Asian Journal*. 14 décembre 2020. Vol. 15, n° 24, pp. 4241-4255. DOI 10.1002/asia.202001051.

SUZUKI, Tohru, OTAKE, Yoshihiro, UCHIMOTO, Satoko, HASEBE, Ayako et GOTO, Yusuke, 2020. Genomic Characterization and Phylogenetic Classification of Bovine Coronaviruses Through Whole Genome Sequence Analysis. *Viruses*. 6 février 2020. Vol. 12, n° 2, pp. 183. DOI 10.3390/v12020183.

TAYLOR, J. D., HOLLAND, B. P., STEP, D. L., PAYTON, M. E. et CONFER, A. W., 2015. Nasal isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* as predictors of respiratory disease in shipped calves. *Research in Veterinary Science*. avril 2015. Vol. 99, pp. 41-45. DOI 10.1016/j.rvsc.2014.12.015.

TAYLOR, Jared D., FULTON, Robert W., LEHENBAUER, Terry W., STEP, Douglas L. et CONFER, Anthony W., 2010. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*. octobre 2010. Vol. 51, n° 10, pp. 1095-1102.

TEGTMEIER, C., ANGENO, null, GRELL, S. N., RIBER, U. et FRIIS, N. F., 2000. Aerosol challenge of calves with *Haemophilus somnus* and *Mycoplasma dispar*. *Veterinary Microbiology*. 15 mars 2000. Vol. 72, n° 3-4, pp. 229-239. DOI 10.1016/s0378-1135(99)00181-9.

TEGTMEIER, C., UTTENTHAL, A., FRIIS, N. F., JENSEN, N. E. et JENSEN, H. E., 1999. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*. décembre 1999. Vol. 46, n° 10, pp. 693-700. DOI 10.1046/j.1439-

0450.1999.00301.x.

TELLIER, Raymond, LI, Yuguo, COWLING, Benjamin J. et TANG, Julian W., 2019. Recognition of aerosol transmission of infectious agents: a commentary. *BMC Infectious Diseases*. décembre 2019. Vol. 19, n° 1, pp. 101. DOI 10.1186/s12879-019-3707-y.

THOMAS, A., DIZIER, I., TROLIN, A., MAINIL, J. et LINDEN, A., 2002. Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Veterinary Research Communications*. juillet 2002. Vol. 26, n° 5, pp. 333-339. DOI 10.1023/a:1016291208229.

THOMAS, Christopher J., HOET, Armando E., SREEVATSAN, Srinand, WITTUM, Thomas E., BRIGGS, Robert E., DUFF, Glenn C. et SAIF, Linda J., 2006. Transmission of bovine coronavirus and serologic responses in feedlot calves under field conditions. *American Journal of Veterinary Research*. 1 août 2006. Vol. 67, n° 8, pp. 1412-1420. DOI 10.2460/ajvr.67.8.1412.

THOMAS, L. H., GOURLAY, R. N., STOTT, E. J., HOWARD, C. J. et BRIDGER, J. C., 1982. A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves. *Research in Veterinary Science*. septembre 1982. Vol. 33, n° 2, pp. 170-182. DOI 10.1016/S0034-5288(18)32331-2.

TIMSIT, Edouard, WORKENTINE, Matthew, SCHRYVERS, Anthony B., HOLMAN, Devin B., VAN DER MEER, Frank et ALEXANDER, Trevor W., 2016. Evolution of the nasopharyngeal microbiota of beef cattle from weaning to 40 days after arrival at a feedlot. *Veterinary Microbiology*. 1 mai 2016. Vol. 187, pp. 75-81. DOI 10.1016/j.vetmic.2016.03.020.

TSENG, Chun-Chieh et LI, Chih-Shan, 2005. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *Journal of Aerosol Science*. 2005. Vol. 36, n° 5, pp. 593-607. DOI 10.1016/j.jaerosci.2004.12.004.

TSUNEMITSU, H., EL-KANAWATI, Z. R., SMITH, D. R., REED, H. H. et SAIF, L. J., 1995. Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*.

décembre 1995. Vol. 33, n° 12, pp. 3264-3269. DOI 10.1128/jcm.33.12.3264-3269.1995.

TSUNEMITSU, H. et SAIF, L. J., 1995. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Archives of Virology*. 1995. Vol. 140, n° 7, pp. 1303-1311. DOI 10.1007/BF01322757.

TSUNEMITSU, H., SMITH, D. R. et SAIF, L. J., 1999. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Archives of Virology*. 1999. Vol. 144, n° 1, pp. 167-175. DOI 10.1007/s007050050493.

TSUNEMITSU, H., YONEMICHI, H., HIRAI, T., KUDO, T., ONOE, S., MORI, K. et SHIMIZU, M., 1991. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *The Journal of Veterinary Medical Science*. juin 1991. Vol. 53, n° 3, pp. 433-437. DOI 10.1292/jvms.53.433.

UTTENTHAL, A., LARSEN, L. E., PHILIPSEN, J. S., TJØRNEHØJ, K., VIUFF, B., NIELSEN, K. H. et NIELSEN, T. K., 2000. Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins. *Veterinary Microbiology*. 20 octobre 2000. Vol. 76, n° 4, pp. 329-341. DOI 10.1016/s0378-1135(00)00261-3.

VALARCHER, J. F., BOURHY, H., GELFI, J. et SCHELCHER, F., 1999. Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *Journal of Clinical Microbiology*. juin 1999. Vol. 37, n° 6, pp. 1858-1862. DOI 10.1128/JCM.37.6.1858-1862.1999.

VAN DRIESSCHE, L., VALGAEREN, B. R., GILLE, L., BOYEN, F., DUCATELLE, R., HAESBROUCK, F., DEPREZ, P. et PARDON, B., 2017. A Deep Nasopharyngeal Swab Versus Nonendoscopic Bronchoalveolar Lavage for Isolation of Bacterial Pathogens from Preweaned Calves With Respiratory Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. mai 2017. Vol. 31, n° 3, pp. 946-953. DOI 10.1111/jvim.14668.

VAN DRIESSCHE, Laura, DE NEVE, Charlotte, HAESBROUCK, Freddy, VAN LEENEN, Katharina, BOYEN, Filip et PARDON, Bart, 2020. Storage time and

temperature affect the isolation rate of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* from bovine bronchoalveolar lavage samples. *BMC veterinary research*. 13 juillet 2020. Vol. 16, n° 1, pp. 238. DOI 10.1186/s12917-020-02456-7.

VEJERANO, Eric P. et MARR, Linsey C., 2018. Physico-chemical characteristics of evaporating respiratory fluid droplets. *Journal of The Royal Society Interface*. février 2018. Vol. 15, n° 139, pp. 20170939. DOI 10.1098/rsif.2017.0939.

VERREAULT, Daniel, MOINEAU, Sylvain et DUCHAINE, Caroline, 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. septembre 2008. Vol. 72, n° 3, pp. 413-444. DOI 10.1128/MMBR.00002-08.

VIJGEN, Leen, KEYAERTS, Els, LEMEY, Philippe, MAES, Piet, VAN REETH, Kristien, NAUWYNCK, Hans, PENSAERT, Maurice et VAN RANST, Marc, 2006. Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. *Journal of Virology*. juillet 2006. Vol. 80, n° 14, pp. 7270-7274. DOI 10.1128/JVI.02675-05.

VISO, M. et ESPINASSE, J., 1988. Utilisation de l'aspiration transtrachéale pour l'étude des affections respiratoires des ruminants. *Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* 24 novembre 1988. pp. 133-136.

VISO, M., ESPINASSE, J. et LAVAL, A., 1983. L'aspiration transtrachéale chez les bovins. Technique et traitement des échantillons prélevés au laboratoire. *Rec. Méd. Vét.* 1983. pp. 159,1059-1064.

WANG, Chia C., PRATHER, Kimberly A., SZNITMAN, Josué, JIMENEZ, Jose L., LAKDAWALA, Seema S., TUFEKCI, Zeynep et MARR, Linsey C., 2021. Airborne transmission of respiratory viruses. *Science*. 27 août 2021. Vol. 373, n° 6558, pp. eabd9149. DOI 10.1126/science.abd9149.

WELLS, W. F., 1934. ON AIR-BORNE INFECTION*. *American Journal of Epidemiology*. novembre 1934. Vol. 20, n° 3, pp. 611-618. DOI 10.1093/oxfordjournals.aje.a118097.

WHITING, S. H. et CHAMPOUX, J. J., 1998. Properties of strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mechanistic

implications. *Journal of Molecular Biology*. 8 mai 1998. Vol. 278, n° 3, pp. 559-577. DOI 10.1006/jmbi.1998.1720.

WILEY, John, [sans date]. A WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATION. .

WILKIE, B. N. et MARKHAM, R. J., 1979. Sequential titration of bovine lung and serum antibodies after parenteral or pulmonary inoculation with *Pasteurella haemolytica*. *American Journal of Veterinary Research*. décembre 1979. Vol. 40, n° 12, pp. 1690-1693.

WOODE, G. N., BRIDGER, J. C. et MEYLING, A., 1978. Significance of bovine coronavirus infection. *The Veterinary Record*. 7 janvier 1978. Vol. 102, n° 1, pp. 15-16. DOI 10.1136/vr.102.1.15.

WORKMAN, Aspen M., KUEHN, Larry A., MCDANELD, Tara G., CLAWSON, Michael L. et LOY, John Dustin, 2019. Longitudinal study of humoral immunity to bovine coronavirus, virus shedding, and treatment for bovine respiratory disease in pre-weaned beef calves. *BMC Veterinary Research*. décembre 2019. Vol. 15, n° 1, pp. 161. DOI 10.1186/s12917-019-1887-8.

XIONG, Huiwen, YE, Xin, LI, Yang, QI, Jun, FANG, Xueen et KONG, Jilie, 2021. Efficient Microfluidic-Based Air Sampling/Monitoring Platform for Detection of Aerosol SARS-CoV-2 On-site. *Analytical Chemistry*. 9 mars 2021. Vol. 93, n° 9, pp. 4270-4276. DOI 10.1021/acs.analchem.0c05154.

XU, L., HARBOUR, D. et MCCRAE, M. A., 1990. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. *Journal of Virological Methods*. janvier 1990. Vol. 27, n° 1, pp. 29-37. DOI 10.1016/0166-0934(90)90143-4.

YANG, Wan et MARR, Linsey C., 2012. Mechanisms by which ambient humidity may affect viruses in aerosols. *Applied and Environmental Microbiology*. octobre 2012. Vol. 78, n° 19, pp. 6781-6788. DOI 10.1128/AEM.01658-12.

ZHANG, Maodong, HILL, Janet E., FERNANDO, Champika, ALEXANDER, Trevor W., TIMSIT, Edouard, VAN DER MEER, Frank et HUANG, Yanyun, 2019. Respiratory viruses identified in western Canadian beef cattle by metagenomic sequencing and their association with bovine respiratory disease. *Transboundary and Emerging*

Diseases. mai 2019. Vol. 66, n° 3, pp. 1379-1386. DOI 10.1111/tbed.13172.

ZHANG, X. M., HERBST, W., KOUSOULAS, K. G. et STORZ, J., 1994. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *Journal of Medical Virology*. octobre 1994. Vol. 44, n° 2, pp. 152-161. DOI 10.1002/jmv.1890440207.

ZHANG, Xinsheng, HASOKSUZ, Mustafa, SPIRO, David, HALPIN, Rebecca, WANG, Shiliang, VLASOVA, Anastasia, JANIES, Daniel, JONES, Leandro R., GHEDIN, Elodie et SAIF, Linda J., 2007. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology*. 20 juin 2007. Vol. 363, n° 1, pp. 1-10. DOI 10.1016/j.virol.2007.03.018.

ZHOU, Jie, OTTER, Jonathan A, PRICE, James R, CIMPEANU, Cristina, MENO GARCIA, Danel, KINROSS, James, BOSHIER, Piers R, MASON, Sam, BOLT, Frances, HOLMES, Alison H et BARCLAY, Wendy S, 2021. Investigating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Surface and Air Contamination in an Acute Healthcare Setting During the Peak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in London. *Clinical Infectious Diseases*. 5 octobre 2021. Vol. 73, n° 7, pp. e1870-e1877. DOI 10.1093/cid/ciaa905.

ZHU, Qinghe, LI, Bin et SUN, Dongbo, 2022. Advances in Bovine Coronavirus Epidemiology. *Viruses*. 21 mai 2022. Vol. 14, n° 5, pp. 1109. DOI 10.3390/v14051109.

ZUNDEL, E., LAMBLIN, J., GOUFFE, D. et DALOU, F., 1985. Prélèvements trachéobronchiques chez les bovins par lavage et aspiration transtrachéale à la seringue. Application au diagnostic bactériologique des maladies respiratoires. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*. 1985. Vol. 69, pp. 321-330.

ANNEXES

Annexe 1 : Relevés cliniques des bovins.

Les températures rectales sont renseignées en °C ; les fréquences respiratoires en mouvements par minute.

Jours post-inoculation	Veau #49		Veau #50		Veau #51	
	Température rectale	Fréquence respiratoire	Température rectale	Fréquence respiratoire	Température rectale	Fréquence respiratoire
J0	38,3	18	38,7	16	39,1	24
J1	38,8	20	38,9	24	38,5	21
J2	38,9	24	38,8	20	38,5	24
J3	38,7	20	38,4	26	38,9	24
J4	38,5	20	39	22	38,6	28
J5	38,5	28	38,7	24	38,9	22
J6	39,2	24	38,8	28	38,5	24
J7	38,9	24	38,2	22	38,4	24
J8	38,5	22	38,6	20	38,2	26
J9	38,8	24	38,9	26	38,8	26
J10	38,7	26	38,9	26	38,7	20
J11	38,3	24	38,7	24	38,9	20

Heures post-inoculation	Veau #96		Veau #101		Veau #11	
	Température rectale	Fréquence respiratoire	Température rectale	Fréquence respiratoire	Température rectale	Fréquence respiratoire
H0	38,9	18	38,4	20	38,6	24
H14	38,4	24	38,4	20	38,5	22
H38	38,8	26	38,3	24	38,4	24
H62	39,1	22	38,3	22	37,9	24
H86	38,7	22	38,2	26	38,5	24

Auteur : Lise Bardou

Approches innovantes pour la détection des agents pathogènes viraux de l'appareil respiratoire des bovins

Les maladies respiratoires sont fréquentes chez les bovins élevés en stabulation et elles ont un impact majeur sur la durabilité du secteur. Avec les méthodes actuelles d'échantillonnage des voies respiratoires, des contraintes techniques rendent difficile le diagnostic étiologique de ces infections respiratoires, si bien qu'il est trop rarement réalisé. Des approches alternatives à la fois simples, moins invasives et peu coûteuses et qui permettraient un diagnostic rapide en élevage, sont donc recherchées. Une étude expérimentale a permis d'évaluer les caractéristiques d'un nouveau dispositif pour le diagnostic des infections respiratoires virales à partir d'une capture des particules en suspension dans l'air et du traitement dans un circuit microfluidique pour la détection virale à l'aide d'une réaction d'amplification linéaire. L'infection par le coronavirus bovin, comme modèle infectieux, a servi à éprouver le dispositif à différentes étapes de son développement.

Mots-clés : collecte, détection, aérosols, coronavirus, bovin

Innovative approaches to the detection of viral pathogens of the bovine respiratory tract

Bovine respiratory diseases are frequent in stall-based farming systems and they have a major impact on the sustainability of the sector. With current methods of airway sampling, several technical constraints make identification of their etiology difficult in cattle, and as a result its underutilization. Simple, less invasive, and inexpensive alternative approaches are therefore being sought to enable rapid diagnosis on farms. An experimental study evaluated the characteristics of a new device for diagnosing viral respiratory infections, based on the capture of airborne particles and processing in a microfluidic circuit, enabling viral detection using a linear amplification reaction. Infection with bovine coronavirus, as an infectious model, was used to test the device at different stages of its development.

Keywords: collection, detection, aerosols, coronavirus, bovine