



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25672

To cite this version:

Grenon, Sarah-Laure . *Isolement et caractérisation moléculaire de l'influenza virus D chez les veaux de boucherie*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 144 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ISOLEMENT ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'INFLUENZA VIRUS D CHEZ LES VEAUX DE BOUCHERIE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Sarah-Laure GRENON

Née, le 21 avril 1995 à Toulouse (31)

Directeur de thèse : Mr Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :

Mr Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mr Gilles MEYER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mr Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ISOLEMENT ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'INFLUENZA VIRUS D CHEZ LES VEAUX DE BOUCHERIE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Sarah-Laure GRENON

Née, le 21 avril 1995 à Toulouse (31)

Directeur de thèse : Mr Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :

Mr Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mr Gilles MEYER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mr Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

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

Directeur par intérim : Frédéric Bousquet

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Geraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

Remerciements

A mon président de thèse,

Monsieur le Professeur Jacques IZOPET

Professeur des Universités Praticien hospitalier *Virologie*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommages respectueux.

A mon jury de thèse,

Monsieur le Docteur Gilles MEYER

Maitre de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Qui m'a confié ce sujet et guidée dans l'élaboration de ce travail,

Pour son soutien, sa patience et sa gentillesse

Pour sa disponibilité, et son aide lors de la rédaction de ce manuscrit,

En témoignage de ma plus profonde gratitude.

Sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Qui a très aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse,

Qu'il soit assuré de ma grande reconnaissance.

Sincères remerciements.

A l'équipe de virologie,

Mlle Justine OLIVA, Mr Elias SALEM et Mme Mariette DUCATEZ pour leur aide et leur participation plus qu'importante dans l'élaboration de cette thèse et donc de ce manuscrit.

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	10
1. LES BRONCHOPNEUMONIES INFECTIEUSES CHEZ LES BOVINS.....	12
1.1. DEFINITION	12
1.2. CONSEQUENCE DE L'ALLOTEMENT	13
1.3. PARTICULARITES DE LA FILIERE VEAU DE BOUCHERIE	14
1.4. IMPORTANCE DES BPI BOVINES.....	15
1.4.1. <i>Importance médicale</i>	16
1.4.2. <i>Importance économique</i>	18
1.4.3. <i>Considérations épidémiologiques</i>	19
1.4.4. <i>Importance sanitaire</i>	20
1.5. LES PRINCIPAUX AGENTS RESPONSABLES DE BPI	22
1.5.1. <i>Les parasites</i>	22
1.5.2. <i>Les bactéries</i>	27
1.5.3. <i>Les virus</i>	30
2. METHODES D'IDENTIFICATION DES VIRUS RESPIRATOIRES.....	44
2.1.1. <i>Le diagnostic indirect</i>	44
2.1.2. <i>Le diagnostic direct</i>	46
3. LES VIRUS INFLUENZA	58
3.1. PRESENTATION GENERALE	58
3.1.1. <i>Terminologie</i>	58
3.1.2. <i>Historique</i>	58
3.1.3. <i>Taxonomie et classification</i>	59
3.2. PROPRIETES STRUCTURALES	61
3.2.1. <i>Morphologie générale</i>	61
3.2.2. <i>Protéines virales</i>	62
3.2.3. <i>Génome</i>	66
3.3. PROPRIETES BIOLOGIQUES	68
3.3.1. <i>Cycle viral</i>	68
3.3.2. <i>Résistance</i>	72
3.4. ÉVOLUTION	72
3.5. PHYLOGENIE	74

3.6.	DIVERSITE D'HOTES	75
3.6.1.	<i>Transmission</i>	77
4.	LES VIRUS INFLUENZA CHEZ LES BOVINS.....	79
4.1.	LE VIRUS INFLUENZA A CHEZ LES BOVINS	79
4.1.1.	<i>Cas naturels, isolement des souches, chronologie</i>	79
4.1.2.	<i>Cas expérimentaux, expression clinique</i>	81
4.2.	LE VIRUS INFLUENZA D : DONNEES ACTUELLES	82
4.2.1.	<i>Propriétés et organisation du virus</i>	83
4.3.	SPECTRE D'HOTES ET RESERVOIR	87
4.3.1.	<i>Épidémiologie</i>	89
4.4.	BILAN SUR LES SOUCHES CIRCULANTES	93
4.5.	L'HOMME PEUT-IL ETRE INFECTE ?.....	94
1.	OBJECTIFS	97
2.	MATERIEL ET METHODES.....	98
2.1.	CHOIX DES ELEVAGES POUR LES PRELEVEMENTS.....	98
2.1.1.	<i>Nombre d'animaux à prélever</i>	98
2.1.2.	<i>Moment du prélèvement</i>	98
2.1.3.	<i>Cartographie des prélèvements</i>	98
2.2.	SYNTHESE DES ELEVAGES VISITES	99
2.3.	CARACTERISTIQUES DES VEAUX PRELEVES	100
2.4.	ÉCOUVILLONNAGE NASAL PROFOND DES VEAUX	101
2.5.	EXTRACTION D'ADN.....	101
2.6.	AMPLIFICATION DU GENE PB1 PAR RT-PCRQ.....	102
2.7.	CULTURE ET ISOLEMENT	102
2.8.	SEQUENÇAGE.....	103
2.9.	ANALYSE DES CO-INFECTIIONS SUR DIFFERENTS ISOLATS OBTENUS	105
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	106
3.1.	VIROPREVALENCE DE L'IDV.....	106
3.2.	ISOLEMENT D'IDV ET SEQUENCES OBTENUES.....	107
3.3.	CARACTERISATION DES LIGNEES OBTENUES	112
3.4.	CO-INFECTIIONS	117
4.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	118
	CONCLUSION GENERALE.....	124

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BPI : Broncho-pneumonie Infectieuse

CP : CytoPathogène

Ct : threshold Cycle (=cycle seuil)

ECP : Effet Cythopatogène

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EN : Ecouvillon nasal

HA : Hémagglutinine

HEF : Hémagglutinine-estérase-fusion

ICV : Influenza C virus

IAV : Influenza A Virus

IDV : Influenza D Virus

IBV : Influenza B virus

IPC : contrôle positif interne endogène

NA : Neuraminidase

NEP : Protéine d'exportation nucléaire

NCP : Non CytoPathogène

NLS : Signaux de localisation nucléaires

NS2 : Protéine non-structurale 2

PA : Polymérase acide

PB1 : Polymérase basique 1

PB2 : Polymérase basique 2

PCR : Polymerase Chain reaction

RNP : Complexe ribonucléoprotéique

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Liste des figures et tableaux

FIGURE 1. SYNTHÈSE DES FACTEURS DE STRESS ET DONC BAISSÉ D'IMMUNITÉ (SCHEMA PERSONNEL)	14
FIGURE 2. ÉLEVAGE DE VEAUX DE BOUCHERIE ; CAILLEBOTTIS, BARRE AU GARROT, CASES COLLECTIVES (D'APRÈS ACTION AGRICOLE PICARDE)	15
FIGURE 3. SINUS RESPIRATOIRES DE BOVIN (D'APRÈS ENVIT, ANATOMIE A1)	16
FIGURE 4. COMPARAISON DES VOLUMES PULMONAIRES CHEVAL/BOVIN (SCHEMA PERSONNEL)	18
FIGURE 5. LARVE L1 DE <i>Dictyocaulus viviparus</i> (D'APRÈS ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE L'UNIVERSITÉ DE PENNSYLVANIE)	23
FIGURE 6. CYCLE ÉVOLUTIF DES DICTYOCAULES (SCHEMA PERSONNEL)	24
FIGURE 7. <i>Dictyocaulus viviparus</i> ADULTES IN SITU (D'APRÈS ENVIT, SERVICE AUTOPSIE)	25
FIGURE 8. TOUX FORTE CHEZ UN BOVIN (D'APRÈS GDS CREUSE)	26
FIGURE 9. REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DU VRSB (D'APRÈS MEYER ET AL EN 2008)	31
FIGURE 10. PATHOGÉNIE DE L'INFECTION PAR LE BHV-1 (SOURCE PERSONNELLE)	36
FIGURE 11. MÉTHODES D'IDENTIFICATION DES VIRUS (SCHEMA PERSONNEL)	44
FIGURE 12. PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (SCHEMA PERSONNEL)	45
FIGURE 13. PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'ELISA INDIRECT (SCHEMA PERSONNEL)	45
FIGURE 14. PRINCIPE DE L'ELISA DIRECT (SCHEMA PERSONNEL)	48
FIGURE 15. PRINCIPE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE (SCHEMA PERSONNEL)	49
FIGURE 16. PRINCIPE GÉNÉRAL DE LA PCR (SCHEMA PERSONNEL)	50
FIGURE 17. PRINCIPE DE LA PCR EN TEMPS RÉEL (SCHEMA PERSONNEL)	52
FIGURE 18. REPRÉSENTATION GRAPHIQUE D'AMPLIFICATION D'ADN PAR Q-PCR (SCHEMA PERSONNEL)	53
FIGURE 19. VIRUS INFLUENZA A EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE (D'APRÈS INTERNET)	62
FIGURE 20. MORPHOLOGIE GÉNÉRALE DES VIRUS INFLUENZA (D'APRÈS HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG)	63
FIGURE 21. ORGANISATION GÉNÉRALE DU VIRUS INFLUENZA B (D'APRÈS HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG)	65
FIGURE 22. ORGANISATION GÉNÉRALE DU VIRUS INFLUENZA C (D'APRÈS HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG)	65
FIGURE 23. ORGANISATION DU GÉNOME DES VIRUS INFLUENZA A (D'APRÈS HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG)	66
FIGURE 24. ORGANISATION DU GÉNOME DES VIRUS INFLUENZA B (D'APRÈS HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG)	67
FIGURE 25. ORGANISATION DU GÉNOME DES VIRUS INFLUENZA C (D'APRÈS HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG)	67
FIGURE 26. LIAISON DE L'HÉMAGGLUTININE (OU HEF) AVEC LES RÉCEPTEURS D'ACIDE SIALIQUE (SCHEMA PERSONNEL)	68
FIGURE 27. DEVENIR DU GÉNOME VIRAL AU SEIN DE LA CELLULE HÔTE (SCHEMA PERSONNEL)	70
FIGURE 28. SCHEMA BILAN DU CYCLE VIRAL ET ACTION DES ANTI-VIRAUX (D'APRÈS UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN – BELGIQUE)	71
FIGURE 29. GLISSEMENTS ANTIGÉNIQUES AU COURS DU TEMPS (D'APRÈS HTTP://ACCES.ENS-LYON.FR)	73
FIGURE 30. PRINCIPE DES CASSURES ANTIGÉNIQUES (D'APRÈS INTERNET)	74
FIGURE 31. RÉPARTITION DES DIFFÉRENTS HÔTES PARMI LES SOUS-TYPES DE VIRUS INFLUENZA (SCHEMA PERSONNEL)	76
FIGURE 32. STRUCTURE DES 7 SEGMENTS GÉNOMIQUES DE L'IDV [52]	84
FIGURE 33. STRUCTURE DE L'ÉCTODOMAINE D'UN MONOMÈRE DE L'IDV [52]	86

FIGURE 34. SEROPREVALENCE D'IDV DANS LES TROUPEAUX BOVIN, OVIN ET CAPRIN EN FRANCE ENTRE 2014 ET 2018 [73].....	90
FIGURE 35. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE L'IDV (SOURCE : MEKATA ET AL, 2017)	93
FIGURE 36. LOCALISATION DES PRELEVEMENTS : DEPARTEMENT, REGION (SCHEMA PERSONNEL)	99
FIGURE 37. DETAILS DES ELEVAGES VISITES (SAUF Q, R, S)	100
FIGURE 38. ARBRE PHYLOGENETIQUE DU SEGMENT HEF. LES IDV ISOLES ICI SONT ENTOUREES EN VERT. LA FLECHE VERTE DESIGNE LES DEUX VIRUS FRANÇAIS ET IRLANDAIS DIFFERENTS DE LA LIGNEE D/OK. LES ARBRES PHYLOGENETIQUES RESTANTS DE TOUS LES AUTRES SEGMENTS SONT DISPONIBLES EN ANNEXES.	110
FIGURE 39. ARBRE PHYLOGENETIQUE DU SEGMENT NS	116
TABLEAU 1. ÉTIOLOGIES INFECTIEUSES DES BPI CHEZ LE BOVIN (SOURCE PERSONNELLE).....	22
TABLEAU 2. LES GRANDES PANDEMIES DE GRIPPE DU 20 ^{ÈME} SIECLE	59
TABLEAU 3. AMORCES UTILISEES POUR L'EXTRACTION D'ARN (CIBLANT LE GENE PB1).....	102
TABLEAU 4. AMORCES UTILISEES POUR AMPLIFIER ET SEQUENCER LE GENOME ENTIER D'IDV	105
TABLEAU 5. VIROPREVALENCE D'IDV DANS LES ELEVAGES A, B ET C	107
TABLEAU 6. VIROPREVALENCE D'IDV DANS LES ELEVAGES D A T.....	107
TABLEAU 7. MUTATIONS D'ACIDES AMINES DANS DES GENOMES ISOLES D'IDV.....	111
TABLEAU 8. DISTANCES GENETIQUES ENTRE LES IDV ISOLES AU SEIN D'UN MEME ELEVAGE	113
TABLEAU 9. DISTANCES GENETIQUES ENTRE LES IDV ISOLES ENTRE LES DIFFERENTS ELEVAGES	114
TABLEAU 10. COMPARAISON DES METHODES DE PRELEVEMENT	121

Introduction

En 2011, aux États-Unis, un nouveau virus Influenza de type C (ICV) a été isolé à partir d'échantillons de porc [1]. D'autres études ont ensuite permis de montrer que ce nouveau virus n'avait en réalité que 50% d'identité génétique avec l'ICV humain et qu'il n'était pas en mesure de se réassortir avec lui. En 2014, à la suite de ces découvertes, les auteurs ont soumis une proposition au Comité international de la taxonomie des virus (ICTV) pour la création d'un nouveau genre dans la famille des virus Influenza : le virus Influenza D (IDV).

Jusqu'à présent, l'IDV a été détecté chez différentes espèces animales et ce, dans presque le monde entier. Certaines études décrivent sa détection moléculaire, mais de nombreuses études sérologiques, sur la présence d'anticorps anti-IDV chez les animaux étudiés, sont également disponibles. À l'heure actuelle, les espèces sensibles à l'IDV semblent être les bovins, les porcs, les petits ruminants et il semblerait que les chevaux puissent également être infectés. Une possible infection humaine par l'IDV demeure une question peu éclairée ; les études sur le modèle du furet (où l'IDV se réplique efficacement) ainsi que la caractérisation des récepteurs de l'IDV laissent à penser que les humains pourraient être sensibles, mais des études sérologiques sérieuses doivent être réalisées pour démontrer cela [1] [2].

En France, l'IDV a été identifié en 2011-2014 chez des bovins présentant des signes cliniques respiratoires en Saône-et-Loire [3]. Cependant, l'ampleur de cette circulation chez les bovins et petits ruminants français n'était pas connue. L'objectif de ce travail est donc de détecter et de caractériser l'IDV chez les veaux de boucherie français afin d'évaluer la prévalence du virus, mais aussi et surtout d'effectuer sa caractérisation moléculaire, afin d'observer la potentielle diversité génétique d'IDV en France, en Europe et donc dans le monde.

Ce sujet, portant sur l'isolement et la caractérisation moléculaire d'IDV chez les veaux de boucherie en France nous a donc semblé intéressant et préoccupant, d'une part par l'impact économique de certains virus grippaux sur les animaux mais aussi, dans une perspective plus lointaine, par la possibilité que les infections animales soient à l'origine de nouvelles souches grippales pandémiques chez l'homme.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les bronchopneumonies infectieuses chez les bovins

Dans un premier temps, nous étudierons les bronchopneumonies infectieuses chez les bovins, sur leur aspect économique, médical et sanitaire mais nous nous pencherons également sur l'importance et la prévalence des agents pathogènes responsables de celles-ci. Nous rappellerons enfin les moyens disponibles actuellement pour identifier ces agents pathogènes.

1.1. Définition

Les « bronchopneumonies infectieuses » (BPI) se définissent comme des affections inflammatoires de l'appareil respiratoire profond, d'allure contagieuse et d'étiologie multifactorielle incluant des agents infectieux relayés par des facteurs liés à la conduite d'élevage et à l'environnement.

Cliniquement, on constate tout d'abord une augmentation brutale de température (on estime alors qu'on est à J0), dépassant 40°C. Dès le lendemain (J1), des troubles respiratoires de type dyspnée ou tachypnée vont être observables. Une dégradation de l'état général et une baisse (voire une absence totale) de l'appétit vont être présentes à J2 selon les agents pathogènes incriminés. Enfin, chez les bovins, une toux sèche et forte peut être observée, mais toujours tardivement.

Si aucun traitement n'est réalisé, la croissance de l'animal sera fortement altérée et sa valeur économique minorée.

Les broncho-pneumonies sont souvent mieux corrélées à leurs circonstances d'apparition qu'à la nature des agents infectieux qui en sont responsables. En effet, la gravité des lésions dépend certes des agents en cause, mais le développement de la maladie est aussi lié aux conditions environnementales et à la conduite d'élevage. Par exemple, dans les élevages naisseurs, le bâtiment et le défaut de transfert de l'immunité colostrale sont des facteurs très souvent impliqués dans les BPI des veaux. **La constitution de lots dans les bâtiments, qui favorise les échanges de particules microbiennes et augmente la réceptivité des animaux, est un facteur majeur d'apparition des BPI** chez les veaux de boucherie, les veaux de nursery et les taurillons (broutards sevrés à l'engraissement pour la production de viande). Si le bâtiment n'est pas correctement géré, s'il n'est pas bien construit, on peut avoir des contaminations entre les différents lots ou encore à chaque achat d'animaux.

1.2. Conséquence de l'allotement

L'allotement d'animaux consiste à regrouper des animaux provenant de différentes exploitations ; ils se contaminent alors entre eux depuis le marché, le camion, le centre de tri et également à la mise en lot.

L'étiologie des BPI consécutives à l'allotement est souvent multifactorielle et peut mettre en cause des agents infectieux comme des bactéries, virus ou parasites, mais des facteurs de risques sont également à prendre en compte. Ceux-ci sont liés à la conduite d'élevage et à l'environnement, et notamment à la baisse d'efficacité du système immunitaire au cours de la mise en lots qui permet la multiplication des pathogènes.

En effet, les jeunes bovins subissent trois types de stress à la mise en lot :

- Un premier stress dû à la séparation de l'environnement d'origine

Celui-ci est d'autant plus important lorsque les animaux ne sont pas collectés individuellement à la ferme mais sur un centre de tri dans lequel ils restent plusieurs jours par exemple, cela engendre en plus une perte de poids.

- Un deuxième lié au sevrage, pour les broutards.
- Le plus important souvent, le **transport**, accentué par des conditions inadaptées (ventilation, abreuvement et densité des veaux), une conduite brutale (à l'origine de contractions musculaires permanentes) ainsi que des facteurs climatiques. La durée du transport influe également sur le stress, si elle est trop courte, mais aussi si elle est trop longue. On estime qu'au-delà de 300km, des perturbations physiologiques sont susceptibles d'apparaître : une déshydratation mais aussi une augmentation des glucocorticoïdes qui accélèrent la consommation de glycogène et engendrent une baisse préjudiciable de l'immunité.

Par ailleurs, une fois dans leur **nouveau logement**, ils rencontrent de nouveaux congénères ; cela peut potentiellement surajouter des facteurs de stress comme l'établissement d'une hiérarchie ou encore un accès à l'auge et à l'abreuvoir limité.

Enfin, des **facteurs environnementaux** peuvent également être peu favorables au maintien et au développement d'une bonne immunité : des pertes thermiques élevées (paillage insuffisant, température ressentie trop faible par exemple), des insuffisances de surface, volume d'air ou de renouvellement d'air qui peuvent alors freiner le métabolisme cellulaire. En parallèle, le froid associé à l'humidité de l'air, et la présence de gaz irritants peuvent être directement agressifs pour l'appareil respiratoire [4].

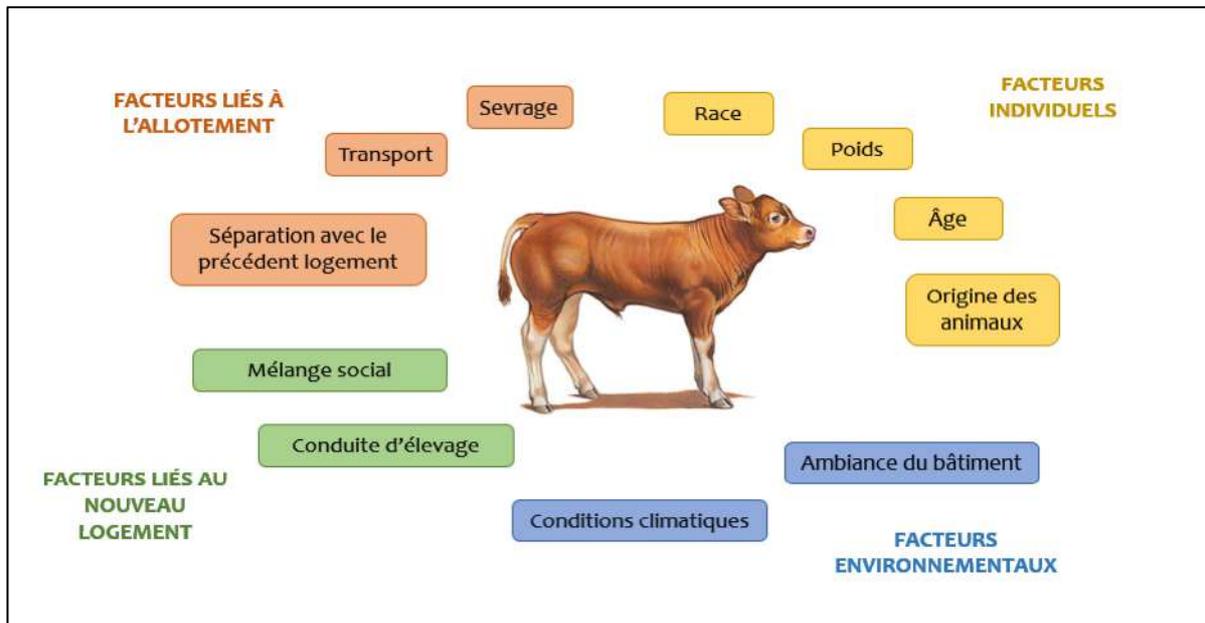


Figure 1. Synthèse des facteurs de stress et donc baisse d'immunité (*schéma personnel*)

1.3. Particularités de la filière veau de boucherie

La production de veaux de boucherie est une filière intégrée dans laquelle l'éleveur n'est qu'un prestataire de service qui sera ensuite rémunéré selon un contrat défini au préalable. Ce sont en majorité les fabricants d'aliments ou certains abatteurs qui s'occupent de toute l'organisation de la production : il s'agit ainsi de constituer des lots homogènes de veaux d'environ huit jours, de livrer les aliments en quantité et en qualité adéquates, de gérer tous les problèmes techniques ou sanitaires et de récupérer les veaux jusqu'à l'abattage et la vente de la viande.

Les veaux de boucherie sont le plus souvent issus du cheptel laitier mais d'autres races mixtes ou à viande viennent parfois compléter la production. Ils sont le plus souvent placés en case individuelle dès leur arrivée, et sont ensuite rapidement

regroupés en cases collectives d'une dizaine de veaux vers l'âge de 8 semaines (obligatoire ensuite selon la directive européenne 97/2/CE du Conseil du 20 janvier 1997). Les veaux sont élevés en moyenne 162 jours mais cette durée peut être raccourcie pour certains veaux croisés et allongée pour les veaux Holstein. Cela se répercute donc aussi sur le nombre de bandes qui peut aller de 1,8 à 2 par an suivant le type racial.

Dans tous les systèmes de production considérés, les facteurs de risques sont les mêmes et sont ceux énoncés dans la figure 1. En revanche, l'élevage en cases, propre aux veaux de boucheries, apporte des facteurs de risque supplémentaires : d'une part, la hiérarchie entre les animaux qui peut être bien plus importante, mais aussi la contagion lors de pathologies qui est forcément plus rapide, et enfin la qualité de l'observation des animaux qui devient plus difficile, et donc moins de probabilité de repérer suffisamment tôt les veaux malades [5].



Figure 2. Élevage de veaux de boucherie ; caillebotis, barre au garrot, cases collectives
(d'après Action agricole picarde)

1.4. Importance des BPI bovines

Les pertes dues aux affections respiratoires représentent plus de 50% des pertes économiques dues aux maladies en Belgique, et 31% aux États-Unis. En France, on considère le coût des traitements des affections respiratoires à plus de 7 millions d'euros par an, et pour seulement 50% des affections traitées (et 75% des

mortalités). L'incidence d'apparition de ces pathologies varie fortement selon le cadre de production.

1.4.1. Importance médicale

Un bovin possède une faible capacité respiratoire et la conformation de ses poumons ne lui permet pas de lutter efficacement contre les germes. Il existe de **nombreux facteurs limitants** à l'origine de cette faible capacité respiratoire :

- Au niveau de l'appareil respiratoire extra-thoracique :

Les narines sont peu mobiles, les cavités nasales sont courtes et étroites, les sinus participent peu à la respiration mais d'avantage au réchauffement de l'air (afin d'isoler thermiquement la boîte crânienne) ainsi qu'au tri alimentaire après rétrolfaction. La quantité d'air capable de pénétrer par les narines est donc assez faible.

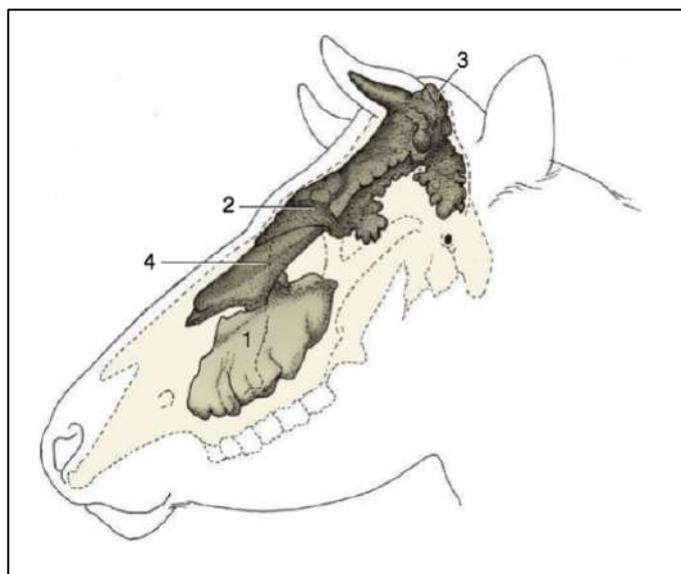


Figure 3. Sinus respiratoires de bovin (d'après ENVT, Anatomie A1)

1 : Sinus maxillaire ; 2 : Sinus frontal rostral 3 : Sinus frontal caudal 4 : Sinus conchal.

Le pharynx est court, le larynx est également petit et peu flexible. Enfin la trachée est rigide (d'autant plus que l'animal est jeune). La trachée est aussi étroite, longée par l'œsophage tout le long de la moitié inférieure de son trajet. Les bronches ont une structure proche, mais moins cartilagineuse que la trachée.

Par ailleurs, la barrière mécanique représentée par l'**escalator muco-ciliaire** et la production de mucus, n'est pas optimale chez cette espèce.

- Au niveau de la cage thoracique :

La cage thoracique est très rigide, d'autant plus chez les bovins allaitants qui ont une musculature très développée. Les espaces intercostaux sont très serrés. Les bovins ne mobilisent quasiment pas le diaphragme pour la respiration, la régulation de la respiration se fait donc essentiellement par la modification de la fréquence respiratoire.

- Au niveau des poumons :

Les poumons sont divisés en lobes, séparés eux-mêmes par des travées interlobulaires épaisses et peu élastiques, limitant ainsi la transmission de l'infection de lobule en lobule mais causant aussi une forte diminution de compliance pulmonaire. De plus, s'il y a hypoventilation d'un lobule, le lobule collatéral ne peut pas compenser.

Les bronchioles respiratoires sont peu ramifiées : l'air arrive directement aux alvéoles, ce qui **favorise le passage des agents infectieux vers les voies profondes** (les microparticules arrivent plus vite aux poumons). De plus, les alvéoles ne peuvent communiquer entre elles ; cette arrivée d'air est donc à l'origine d'une fragilisation des alvéoles. Si on a une surpression alvéolaire, cette alvéole éclate car elle ne peut pas compenser son rapport ventilation/perfusion avec une autre alvéole. On a donc un risque de rupture alvéolaire et donc d'emphysème.

Les bovins sont finalement les Mammifères disposant de la plus petite capacité d'échange gazeux par rapport à leur taille. A titre de comparaison, le volume à disposition chez les bovins (12-14L pour 490 kg) est égal au tiers de celui des chevaux à poids égal (40-42L pour 490 kg). Le bovin respire donc plus vite une plus grande quantité d'air. Il inhale donc plus d'agents pathogènes, et les structures pulmonaires sont fragilisées par l'impact de l'air. En effet, étant très compartimentées et rigides, elles empêchent les déviations de secours en cas d'obstruction mais favorisent aussi l'accumulation de germes et de toxines dans les secteurs lésés.



Figure 4. Comparaison des volumes pulmonaires cheval/bovin (schéma personnel)

Ainsi, l'arbre respiratoire est **très résistant** à l'écoulement de l'air. Cela a comme conséquence un volume d'air résiduel à la fin de chaque inspiration qui reste élevé, logeant dans les nombreux espaces morts. Enfin, les gaz éructés (notamment lors de ration riche en maïs ou de transitions alimentaires courtes) sont ré-inhalés au tiers et sont toxiques pour l'animal.

Les BPI se traduisent donc par des troubles souvent sévères avec une morbidité importante et une mortalité non négligeable, comme nous allons le voir dans la partie suivante.

1.4.2. Importance économique

Les troubles de santé au sens large diminuent l'efficacité économique des ateliers d'engraissement, comme dans toute production animale. Le principal problème rencontré dans ces ateliers (veaux de boucherie ou jeunes bovins) concerne les **troubles respiratoires**.

La mortalité des bovins suite à des troubles respiratoires est fréquente et on estime qu'elle représente plus de la moitié de la mortalité totale en ateliers d'engraissement [6].

En élevage de veaux de boucherie, Bareille et al. ont évalué l'impact économique d'un épisode de trouble respiratoire qu'on peut rencontrer classiquement (de

gravité moyenne), et l'a estimé à 26€ par veau acheté en élevage au seau et 36€ par veau acheté en élevage au DAL (distributeur automatique de lait). Cette estimation inclut les frais de prévention. En revanche, le coût des traitements collectifs n'a pas été inclus et on estime qu'il représente presque la moitié de l'impact économique estimé [7].

Dans une autre étude réalisée sur 61 exploitations (environ 1200 bovins regroupés en 100 lots), il a été montré un taux de morbidité lié aux troubles respiratoires, de 18,1% chez les jeunes bovins mis en lots. Par ailleurs, chez les jeunes bovins présentant des troubles respiratoires, les performances de croissance sont moins bonnes que celles des jeunes bovins sains : on note une perte de 61 à 108 grammes par jour de GMQ et un allongement de la durée d'engraissement allant de 44 à 59 jours supplémentaires selon l'intensité des signes cliniques. Enfin, il a été démontré qu'une exploitation-type « engraisseur spécialisé » pouvait subir une perte de revenu annuel allant de 11,4% à 26,4% en cas de situations sanitaires dégradées (variant selon la gravité de la situation) [8].

1.4.3. Considérations épidémiologiques

Les résultats sanitaires sont à interpréter en fonction de la morbidité et de la mortalité observées sur l'ensemble du troupeau. Il est établi que la mortalité due à des problèmes respiratoires ne doit pas dépasser 1% et la morbidité ne doit pas dépasser 25%. En effet, il est normal d'avoir des contaminations directes dans des élevages d'animaux en lot, mais il est anormal que ces animaux en meurent.

En dessous de 20-30% de morbidité il est normal d'avoir quelques symptômes, mais il est anormal d'observer une mortalité élevée [9].

Cette mortalité des veaux en élevage bovin allaitant peut être importante ; Mounaix et al. ont montré qu'à 6 mois, la mortalité était en moyenne de 8,36%, avec des différences significatives selon **la race** (variation de 5,43% à 15,16%) et selon **le sexe** (7,04% à 9,54%). L'effet race est en effet très fort : les troupeaux de races rustiques présentent souvent une *meilleure aptitude au vêlage* ainsi que des *taux de renouvellement faibles*, et donc une moindre proportion de primipares, ce qui engendre un plus faible taux de mortalité des veaux. Il peut aussi s'expliquer par l'étroitesse des voies

respiratoires chez les races allaitantes de type culard, telles que les blanc-bleu-belge par exemple. De même, le taux de mortalité varie selon **la parité** : pour les veaux issus de mères primipares, on l'estime à 9,72% alors qu'il est de 7,58% pour ceux nés d'un second vêlage, et de 6,58 % pour les autres veaux [10].

Aux États-Unis, l'équipe de Donovan et al. a étudié les facteurs individuels susceptibles d'impacter l'état de santé du veau entre 0 et 6 mois. Selon eux, **le taux de protéines sériques totales**, mesurée à la naissance, est un facteur de risque significatif de mortalité ; quand ce dernier augmente de 4 à 5 g/dL, le taux de mortalité du veau diminue de façon très importante, il diminue également légèrement quand le taux augmente de 5,0 à 6,0 g/dL et il ne diminue quasiment pas quand le taux dépasse les 6g/dL [11].

Concernant les pathologies, le taux de protéines sériques totales est également un **facteur de risque significatif** pour l'apparition d'une pathologie, et ce peu importe l'âge d'apparition et la gravité de la pathologie en question. Le taux de protéines sériques totales et l'apparition d'une septicémie sont étroitement corrélés et une influence de la saison de naissance a été démontrée (restreinte à hiver ou été).

Le taux de protéines sériques totales est également étroitement corrélé à l'apparition d'une pneumonie, mais au contraire de la septicémie, le risque de morbidité n'est pas constant dans le temps ; autrement dit, l'immunité colostrale permet une protection du veau contre le développement d'une pneumonie tôt dans la vie, mais cet effet disparaît avec le vieillissement du veau.

1.4.4. Importance sanitaire

L'importance sanitaire des BPI chez les bovins est essentielle car le traitement repose très fréquemment sur l'utilisation d'**antibiotiques**. Cela s'explique par le fait que les bactéries sont souvent impliquées dans les affections pulmonaires, soit directement soit en surinfection. Le traitement antibiotique est alors en réalité quasiment toujours nécessaire.

Les bactéries impliquées dans les BPI sont majoritairement extracellulaires, on va donc utiliser des antibiotiques auxquels elles sont sensibles, et qui agissent dans les sécrétions bronchiques, à savoir ; les macrolides, les tétracyclines, ainsi que les

phénicolés. D'autres molécules de dernière génération (céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération, fluoroquinolones) montrent une grande efficacité pour lutter contre les surinfections bactériennes, mais leur utilisation est depuis peu très règlementée puisqu'elles font partie de familles **d'antibiotiques** dits « **critiques** ». Elles ne sont ainsi autorisées que dans le cadre de la lutte contre des bactéries présentant des résistances à tous les autres antibiotiques (utilisation sous plusieurs conditions).

Il peut arriver que des antibiotiques soient utilisés en prévention (par exemple lors de rassemblement de jeunes bovins ou lors de périodes à risques). Ce genre de pratique, **susceptible de favoriser l'émergence d'antibiorésistances** est aujourd'hui à proscrire.

Comme nous l'avons vu précédemment, les particularités anatomiques respiratoires du bovin font que **l'accès aux zones lésées est rapidement limité**, rendant difficile l'obtention d'une concentration en antibiotiques suffisante au niveau de celles-ci. C'est pourquoi le traitement se doit d'être précoce et fort. L'emploi des antibiotiques lors de troubles respiratoires est alors souvent basé sur la **métaphylaxie** ; lorsque quelques bovins sont atteints de troubles respiratoires, c'est l'ensemble du lot qui va être mis sous traitement et pas seulement les animaux présentant les signes cliniques. En effet, l'absence de signes cliniques ne signifie pas une absence de pathogènes, et la forte probabilité de contagion des BPI nous incite à traiter afin que l'antibiotique puisse diffuser d'une façon plus optimale.

Ainsi, dans ce contexte de réduction de l'utilisation des antibiotiques, par la mise en place du plan Eco-Antibio et des législations récentes qui restreignent l'emploi des antibiotiques de dernière génération, il est **aujourd'hui primordial de mieux diagnostiquer et donc connaître les agents pathogènes responsables de BPI**. Cela permet d'une part de développer des mesures préventives (vaccination, aménagement des bâtiments...) et d'autre part de choisir la molécule adaptée en cas de maladie.

1.5. Les principaux agents responsables de BPI

L'importance d'un agent pathogène est liée d'une part à sa prévalence sur le terrain, et d'autre part à son pouvoir pathogène, étudié en conditions expérimentales ou lors d'études terrain. Le tableau 1 indique les principaux agents identifiés actuellement.

Pouvoir pathogène majeur	Fréquence élevée	<u>Virus</u> : VRSB <u>Bactéries</u> : <i>M. Haemolytica</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>M. bovis</i> <u>Parasites</u> : <i>Dictyocaulus viviparus</i>
	Fréquence faible à nulle	<u>Virus</u> : BHV-1 (IBR) <u>Bactéries</u> : <i>Mycobacterium bovis</i> , <i>Mycoplasma mycoïdes spp mycoïdes</i>
Pouvoir pathogène faible à modéré	<u>Virus</u> : BVD virus, Pi III, Adenovirus 3, coronavirus <u>Bactéries</u> : <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Histophilus Somni</i> , <i>Chlamydia Psittaci</i>	

Tableau 1. Étiologies infectieuses des BPI chez le bovin (*tableau personnel*)

1.5.1. Les parasites

Bien que rarement impliqués dans les syndromes des BPI hivernales, certains parasites peuvent occasionner des lésions pulmonaires favorisant les surinfections virales et bactériennes.

Le principal parasite pulmonaire des bovins est *Dictyocaulus viviparus*, un nématode à l'origine de la Dictyocaulose, aussi appelée bronchite vermineuse. Cette maladie est une helminthose respiratoire due au développement du parasite dans la trachée et les grosses bronches des bovins.

1.5.1.1. Étiologie

D. viviparus est un nématode blanchâtre de la famille des Dictyocaulidés. L'adulte mesure 5 à 8 cm de long sur 0,5 mm de diamètre et est bien visible à l'œil nu. Il se nourrit de sécrétions trachéo-bronchiques et ne se fixe pas : il reste libre dans les bronches et la trachée.



Figure 5. Larve L1 de *Dictyocaulus viviparus* (d'après École vétérinaire de l'Université de Pennsylvanie)

1.5.1.2. Épidémiologie

1.5.1.2.1. Résistance

Les stades libres du parasite sont très peu résistants dans le milieu extérieur, avec une survie limitée au pâturage (d'où l'importance des conditions climatiques car la dessiccation et les UV tuent les larves).

1.5.1.2.2. Sources de parasites et sensibilité

Les sources principales de parasites en début de saison de pâture sont les bovins adultes porteurs chroniques, qui font un peu d'hypobiose. En revanche, on note une grande sensibilité des jeunes et des adultes non immunisés. Il y a développement progressif d'une immunité contre les ré-infestations.

Ainsi, le schéma épidémiologique classique est le suivant : les porteurs asymptomatiques excrètent des larves L1 dans leurs bouses en début de saison de pâture (mars-avril) mais pas en grande quantité. Pour que le système s'emballe, il faut un relais amplificateur : un jeune bovin ou un adulte non immunisé. Ces derniers ingèrent les larves et produisent un très grand nombre d'œufs.

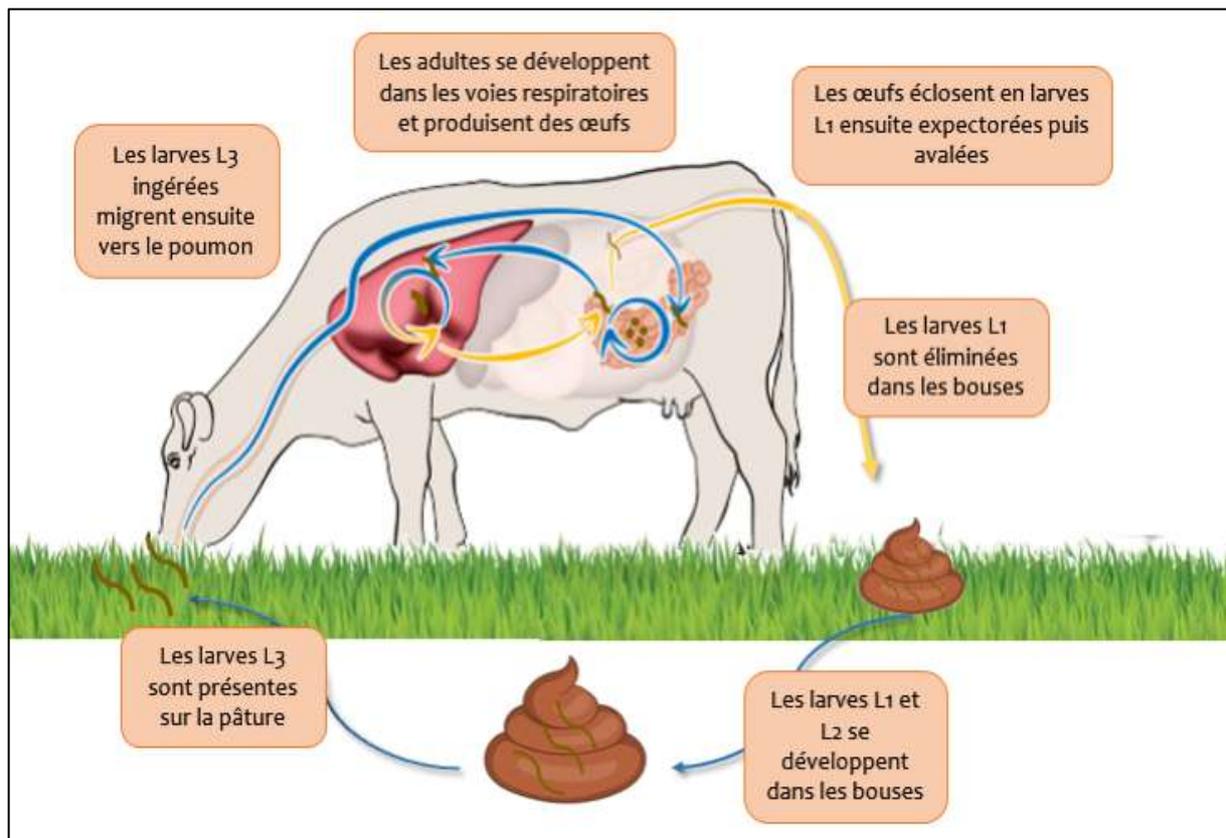


Figure 6. Cycle évolutif des dictyocaulus (*schéma personnel*)

Si ensuite, on rajoute les nouveaux veaux dans la pâture, ces derniers vont évoluer dans un milieu très contaminé. Ils vont donc tomber malades et excréter également énormément. Ainsi, du fait de cette étape d'amplification nécessaire, souvent les signes cliniques ne seront observés que 2-3 mois après la mise à l'herbe.

1.5.1.3. **Pathologie**

Le parasite va avoir deux actions pathogènes sur l'organisme du bovin.

➤ **Une action mécanique et irritative :**

Elle est due aux vers adultes (on estime que 200 vers adultes suffisent pour déclencher un épisode clinique) mais elle est aussi due aux larves L4 qui migrent dans le parenchyme pulmonaire. C'est un moment clef de la pathogénie, qui expliquera ensuite le phénomène allergique avec l'œdème aigu du poumon (OAP). On observe également une épithélialisation des parois alvéolaires due aux œufs et aux larves L1.



Figure 7. *Dictyocaulus viviparus* adultes in situ (d'après ENVT, service autopsie)

➤ Une action antigénique

Chez les animaux bien immunisés, il y a un blocage des larves L4 dans les nœuds lymphatiques mésentériques. En revanche, chez les animaux qui ne bloquent pas le parasite au niveau des nœuds lymphatiques, il y a une inflammation à composante allergique au niveau des poumons pouvant entraîner un OAP.

1.5.1.4. Clinique

La parasitose est à l'origine de deux syndromes.

1.5.1.4.1. Syndrome d'obstruction bronchique

On le trouve chez les jeunes bovins (< 1-2 ans) et de plus en plus chez les vaches adultes non immunisées, notamment les laitières. L'animal est en détresse respiratoire.

On observe une toux quinteuse forte, de la polypnée, de la dyspnée, des accès de suffocation, un œdème aigu du poumon et des râles sifflants à l'auscultation (à l'inspiration). L'animal a les yeux exorbités et peut saliver beaucoup.



Figure 8. Toux forte chez un bovin (d'après GDS Creuse)

Au début, quelques individus toussent, puis on a une extension dans le troupeau (parfois 70% des animaux sont atteints), on a une impression de contagion. Ceci s'accompagne d'une chute de la production laitière (jusqu'à moins 40% au pic de lactation).

1.5.1.4.2. **Syndrome asthmatiforme**

On le trouve chez des animaux d'1 à 3 ans ou plus, ayant déjà été en contact avec le parasite. Il survient brutalement lors de la migration des larves L4 dans le parenchyme pulmonaire. Les symptômes, d'apparition extrêmement brutale sont une hyperthermie (39-40°C), une chute de la production laitière, une polypnée sévère, des râles crépitants à l'inspiration, un œdème aigu du poumon et/ou une défaillance cardiaque conduisant à la mort en 24-36h. La toux est cependant rare dans cette forme car elle est due aux vers adultes.

1.5.2. Les bactéries

1.5.2.1. Les mycoplasmes

Les mycoplasmes sont très fréquemment isolés dans le cas d'affections respiratoires chez les bovins, en revanche, on estime qu'ils ne sont pathogènes dominants que dans la moitié des cas car toutes les espèces ne possèdent pas le même pouvoir pathogène [12]. Un seul type, *Mycoplasma bovis*, est actuellement considéré comme un pathogène respiratoire chez les jeunes bovins. Sa prévalence est importante en élevages de veaux de boucherie.

Les mycoplasmes se différencient des autres bactéries par leur absence de paroi, qui les rend ainsi résistants aux antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi, comme les bêtalactamines. En revanche, ils sont peu résistants dans le milieu extérieur mais parviennent à survivre jusque 230 jours dans le fumier, et plusieurs semaines sur matériel humide. Par ailleurs, ils possèdent un système génétique complexe constitué de 13 gènes, codant pour une famille de protéines de surface, les Vsps, impliquées dans la variabilité antigénique. Ces dernières lui permettent d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte [13].

La transmission est horizontale, par contact direct entre animaux mais aussi via les aérosols, l'alimentation, l'eau. Les sécrétions nasales d'animaux infectés porteurs sont les sources principales du virus.

Les affections causées par *M. bovis* sont diverses, allant des pneumonies aux arthrites et mammites. Lors d'affections respiratoires, *M. bovis* va causer des lésions inflammatoires chroniques, laissant l'opportunité à d'autres agents pathogènes d'infecter aussi les poumons.

Le tableau clinique observé n'est pas spécifique : on peut avoir une hyperthermie, une baisse d'appétit, un abattement, un jetage, et des troubles respiratoires classiques (tachypnée, dyspnée expiratoire).

1.5.2.2. Les pasteurelles

Les trois principales pasteurelles pathogènes chez les bovins sont *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*.

Il existe un portage sain nasopharyngé de ces bactéries chez le veau. Le mécanisme général d'apparition de la pasteurellose bovine est la présence d'un phénomène initiateur (stress, virus, mycoplasme...), qui va alors faciliter la multiplication d'une pasteurelle et surtout sa migration dans les voies respiratoires profondes. Souvent, *M. haemolytica* et *P. multocida* sont présentes en même temps, mais aussi parfois seules, ou encore avec des virus.

La présence concomitante d'un virus va permettre à la pasteurelle, par multiples mécanismes (par exemple une baisse d'immunité locale), de prendre part à l'infection.

Lorsqu'elles sont présentes ensemble, il est difficile de déterminer en pratique si *M. haemolytica* précède l'infection par *P. multocida* ou inversement, car les enjeux en termes de temps sont trop serrés. De manière générale, il faut retenir qu'il existe de très nombreuses co-infections, que *M. haemolytica* possède un pouvoir pathogène majeur qui suffit à causer la mort de l'animal, alors que *P. Multocida* est très souvent présente avec d'autres pathogènes lors de BPI sévères.

Jusqu'aux années 1995, c'était *M. haemolytica* qui prédominait en Europe de l'ouest, mais aujourd'hui, c'est *P. multocida* qui est majoritaire (environ dans 2/3 des cas), surtout dans les élevages en lots (notamment en veaux de boucherie).

Les pasteurelles sont des « agents de grippe » et ont donc une saisonnalité puisque leur prévalence augmente en automne-hiver. Toutefois, cela reste biaisé par la rentrée des bovins à l'étable, qui engendre notamment une dégradation des conditions d'ambiance, une augmentation de la densité animale et donc une circulation favorisée des agents grippaux.

Les jeunes bovins restent les plus touchés, souvent en lots ou regroupés, mais les pasteurelloses représentent néanmoins 25% des affections respiratoires de bovins adultes [14].

1.5.2.2.1. **M. Haemolytica**

Réputée comme étant la pasteurelle la plus pathogène chez les bovins, l'expression du pouvoir pathogène de *M. haemolytica* est conditionnée par une première multiplication locale dans le nasopharynx, concomitante à une altération des mécanismes de défense de l'appareil respiratoire. La bactérie adhère alors à l'épithélium grâce à des

facteurs d'attachement (pili, capsule), et ce d'autant plus facilement que la muqueuse épithéliale a été lésée précédemment par un agent infectieux primaire. La contamination de l'appareil respiratoire profond se fait via l'inhalation d'exsudats virulents stagnants dans les régions postérieures des cavités nasales où la concentration en bactéries est très élevée en début de maladie. Au sein du poumon, la multiplication bactérienne conduit à une réaction inflammatoire massive qui crée des lésions typiques de pneumonie broncho-alvéolaire fibrineuse ou fibrino-hémorragique avec présence de foyers de nécrose. La bactérie a une faible résistance dans le milieu extérieur (moins de 7 jours).

Cliniquement, un animal atteint va présenter une polypnée, un jetage mucopurulent, du larmolement et de la toux, une dyspnée expiratoire sévère, une douleur à la respiration si une pleurésie est présente.

1.5.2.2.2. P. Multocida

Il existe cinq sérogroupes, et le séro groupe A3 est celui que l'on isole le plus souvent sur les bovins atteints de BPI. Bien qu'il s'agisse de la pasteurelle la plus fréquemment isolée ces dernières années, sa pathogénicité semble limitée. Elle est donc considérée comme pathogène mineur.

1.5.2.2.3. H. Somni

Le troisième agent de pasteurellose est *Histophilus somni* mais son impact est moins connu en France par rapport aux États-Unis où il est considéré comme la pasteurelle la plus pathogène et semble donc d'avantage problématique. Toutefois, cela peut également être dû au fait qu'il est beaucoup moins recherché en France, car sa recherche présente quelques inconvénients et notamment des conditions de culture contraignantes.

Cliniquement, le pathogène provoque une méningo-encéphalite thromboembolique mais également d'autres affections, notamment respiratoires.

Comme pour les autres pasteurelles, les bovins sont très souvent porteurs de cette bactérie au niveau du nasopharynx. Si une bronchopneumonie peut être initiée par un stress, résultant de l'action synergique de virus et de bactéries ; *H. somni* peut ensuite provoquer une pneumonie voire une pleurésie fibrineuse.

1.5.3. Les virus

Les principaux virus respiratoires des bovins sont le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB), l'herpèsvirus bovin de type 1 (BoHv-1), le coronavirus bovin (BCoV), le virus parainfluenza bovin de type 3 (BPi3), l'adénovirus bovin de type 3 (Ad. B3), et le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV).

1.5.3.1. Le VRSB

Le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB), récemment reclassifié en orthopneumovirus bovin est considéré comme un des agents pathogènes les plus importants des affections respiratoires bovines. En France, on estime que plus de 50% des bovins adultes sont séropositifs pour le VRSB, montrant que le virus circule de façon importante et régulière dans les élevages.

D'ailleurs, 2 études ont permis de montrer qu'en élevage naisseur allaitant, le virus était présent chez 49.2% (broutards charolais) et 61.2% (veaux d'Aveyron) des jeunes bovins présentant des troubles respiratoires [15].

1.5.3.1.1. Taxonomie

Le VRSB appartenait au genre *Pneumovirus*, de la sous-famille des *Pneumovirinae*, de la famille des *Paramyxoviridae* (Van Den Hoogen et al, 2001).

Une nouvelle classification a permis de modifier la famille des *Paramyxoviridae*. Le VRSB a pour nouveau nom l'Orthopneumovirus bovin, appartenant au genre Orthopneumovirus de la famille des *Pneumoviridae*.

1.5.3.1.2. Caractéristiques

C'est un virus à ARN monocaténaire, linéaire, de polarité négative. Le génome est constitué d'environ 15000 nucléotides avec 10 gènes codant pour 11 protéines structurales et non-structurales [17] : deux protéines non structurales NS1 et NS2, trois protéines de nucléocapside N, P, L, deux protéines de matrice M et M2 et trois protéines d'enveloppe SH, F et G (figure 10). Les protéines de surface F et G sont des déterminants antigéniques du virus.

- la **glycoprotéine de fusion F** permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire de la cellule cible, mais aussi la fusion des cellules infectées avec d'autres cellules non infectées (formation de syncytia).

- la **glycoprotéine G** permet l'attachement du virus à la cellule cible. Elle est la source de la variabilité entre souches ; en effet, une étude a montré que sur la base de la variabilité de la séquence codant pour la glycoprotéine G, le VRSB pouvait être classé en six sous-groupes génétiques différents, tandis qu'une analyse similaire des gènes N et F ne donnait que cinq sous-groupes, illustrant le taux plus élevé d'évolution du gène G [18].

Le virus est enveloppé, et est donc fragile, notamment en matière d'exposition à la chaleur : 10 minutes à 56°C et quelques heures à 37°C suffisent à l'éliminer, il ne résiste donc pas dans le milieu extérieur. Il est également très sensible aux solvants des lipides (éther, chloroforme), et ce, toujours du fait de son enveloppe.

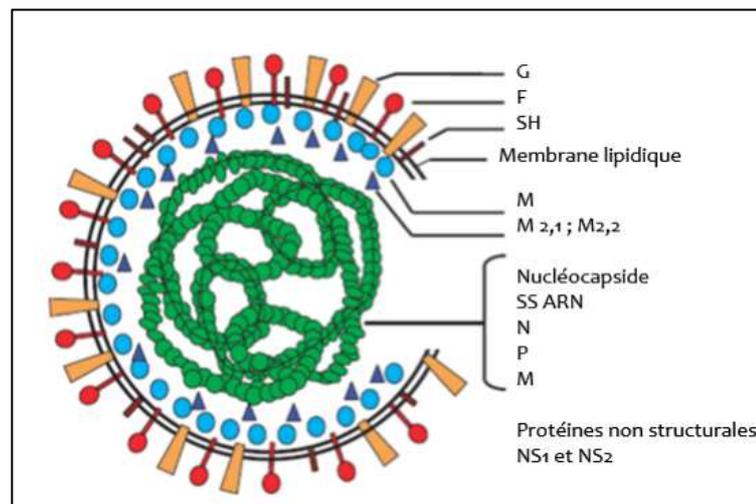


Figure 9. Représentation schématique du VRSB (d'après Meyer et al en 2008)

1.5.3.1.3. Épidémiologie

Lorsqu'un élevage est atteint, le taux de morbidité est important puisqu'on estime qu'il varie entre 60 et 80%. Le taux de mortalité, lui, reste en général faible et inférieur à 5% (0,5 à 1,2%) mais peut atteindre 30% dans les cas où des formes de détresse respiratoire sévère sont observées.

Le virus est ubiquitaire et présent partout dans l'environnement. Sa source principale est l'excrétion par les animaux infectés, au cours de l'expiration. Les principaux réservoirs sont les bovins adultes.

La transmission se fait essentiellement de manière directe par contact muflé à muflé, et indirecte via les aérosols (expectorations ou apport de matériel contaminé proche du muflé par exemple, à moins de 5m).

La voie d'inoculation est le tractus respiratoire.

Les bovins de tout âge sont susceptibles d'être infectés, mais **les jeunes bovins** demeurent plus sensibles, et sont aussi les plus sévèrement touchés. *Comme vu précédemment*, les veaux de boucherie, et les jeunes veaux à viande de 3 à 6 mois, sont particulièrement des populations à risques. De plus, 16 à 71% des troubles respiratoires chez les veaux de moins de 1 an en élevages allaitants sont dus au VRSB.

Les relations entre VRSB et troubles respiratoires sont variables selon la classe d'âge mais aussi selon divers facteurs d'élevage :

➤ Les facteurs climatiques

Les infections sont plus présentes en automne-hiver, non seulement du fait du taux d'humidité important mais aussi du fait des températures basses, qui vont allonger la durée de vie du virus dans l'environnement.

➤ La densité

Elle va directement impacter la transmission du virus, qui ne dépend en revanche pas du nombre d'animaux [19].

➤ L'âge

Les jeunes animaux sont les plus sévèrement touchés, comme vu précédemment.

1.5.3.1.4. Symptômes

Il existe plusieurs formes de la maladie :

- Une forme subclinique tout d'abord, dont la fréquence est élevée puisqu'on estime qu'elle touche 21 à 47 % des troupeaux et jusqu'à 71% des bovins.
- Une forme aiguë, qui peut évoluer en deux phases :

1- Un syndrome respiratoire d'apparition brutale, de type grippal, avec un jetage important, une conjonctivite, une toux sèche et persistante, un abattement minime à modéré, accompagnée d'une tachypnée et d'une hyperthermie, élevée (jusque 42°C) mais fugace. L'excrétion virale est alors maximale.

Cette forme est la plus fréquente et pourtant la moins spécifique, donc la moins reconnaissable. L'animal peut guérir spontanément suite à ce syndrome fébrile sans apparition d'autres symptômes (notamment pas de signes respiratoires), ou peut évoluer vers d'autres formes (phase 2 notamment).

Les particularités évolutives font qu'il est difficile de prédire les dégâts sur l'appareil respiratoire.

2- Une aggravation de la maladie (*deuxième phase*), pouvant survenir très vite chez les jeunes animaux (de plusieurs jours à plusieurs semaines après la première phase) âgés de moins de 18 mois. On note chez ces animaux une détresse respiratoire importante avec des signes cliniques reflétant cette dyspnée (encolure tendue, plainte à l'expiration, respiratoire de type abdominale) mais aussi du ptyalisme, un appétit inexistant et des muqueuses cyanosées.

L'évolution se fait soit vers la guérison, soit vers la mort par insuffisance respiratoire liée à un bronchospasme sévère, soit vers une aggravation des troubles cliniques par surinfection bactérienne. En effet, l'épithélium cilié de l'appareil respiratoire présente à ce stade des lésions importantes à l'origine du passage potentiel de bactéries dans les voies respiratoires profondes ; l'infection se complique alors souvent d'infections bactériennes secondaires, susceptibles d'engager le pronostic vital.

Chez des animaux plus âgés ou ayant déjà été infectés, on peut parfois rencontrer une forme atténuée avec un jetage séreux peu abondant, une toux sèche, une hyperthermie, évoluant vers la guérison en 1 à 2 semaines.

1.5.3.2. Virus de l'IBR

La rhinotrachéite infectieuse bovine, dite IBR, est une maladie infectieuse, inoculable, de contagiosité moyenne.

1.5.3.2.1. Situation actuelle

Cette maladie a de moins en moins d'importance clinique puisque la forme clinique est rarement observée en France, aujourd'hui l'importance est surtout réglementaire. C'est, en effet, une maladie réglementée par l'État depuis 2006, rendant obligatoire le dépistage sérologique annuel des effectifs bovins, le dépistage sérologique à l'introduction pour l'ensemble des bovins (de tout âge), et la vaccination des bovins dont le résultat sérologique s'est révélé non négatif.

La situation épidémiologique (évaluée sur la base de la séropositivité) est très variable entre continents, entre pays européens voire même entre régions françaises. Par exemple, la Bretagne, qui a mis en place très tôt des mesures de dépistage et de contrôle, est indemne d'IBR depuis déjà une dizaine d'années. Ces statuts sont donc très variables en fonction du bassin de production, de l'investissement mis en place pour maîtriser l'infection et du type d'élevage pratiqué.

Le principal risque lié à un statut non indemne est la perte de possibilités d'exporter et la perte de marchés commerciaux. Chaque fois qu'un cheptel est parvenu à se débarrasser de l'IBR, c'est-à-dire qu'il ne contient plus d'animaux séropositifs, il bénéficie de la qualification de cheptel indemne (il peut aussi être en cours d'assainissement).

Par exemple, le taux de qualification en Occitanie a largement progressé, passant de 36% d'élevages indemnes en fin de campagne 2016, à 75% en fin de campagne 2018, soit une progression de +39% en 2 ans [20].

1.5.3.2.2. Taxonomie

La maladie fut signalée en 1950 au Colorado sous d'autres noms, tels que « nez rouge », « pneumonie de la poussière » ou encore « rhinotrachéite nécrotique ».

Le virus responsable de la maladie ne sera isolé qu'en 1956 par Madin. En France, l'isolement se fit en 1967 [21].

Cette maladie, qui ne peut infecter que les bovinés (bison, buffles, gnous...), est due à l'Herpès virus bovin de type 1 (BoHV-1 ou virus IBR, infectious bovine rhinotracheitis) appartenant à la famille des *Herpesviridae*, sous-famille des *Alphaherpesvirinae* [22] et genre *Varicellovirus*. Comme tout Herpes virus, il a donc des capacités de latence chez l'hôte.

1.5.3.2.3. Caractéristiques

C'est un virus de grande taille, qui mesure de 150 à 200 nm. C'est un virus à ADN, double brin, dont le génome code pour 21 protéines structurales, dont 10 glycosylées [23]. Son tropisme cellulaire comprend les cellules épithéliales, les cellules mononuclées sanguines et les neurones.

Du fait de son enveloppe, il est très peu résistant dans l'environnement et notamment aux températures élevées, aux agents physiques, et aux solvants des lipides, mais il survit en revanche très bien au froid. Il est aussi détruit par les rayons UV et les détergents usuels.

1.5.3.2.4. Épidémiologie

La transmission est principalement directe entre les animaux par contact mufle-mufle mais aussi par voie aérienne sur de courtes distances. La source principale de virus est le jetage nasal, qui contient du virus dès 24h post-infection [24].

Une transmission génitale est également possible via le sperme et les sécrétions vaginales. Enfin la transmission peut être congénitale lors d'une infection en fin de gestation.

La période d'excrétion primaire va de 10 à 16 jours avec un pic d'excrétion entre le 6^{ème} et le 10^{ème} jour post-infection. Par la suite, l'excrétion dépend beaucoup du statut immunitaire de l'animal : plus il est immunisé et moins il excrète le virus.

Les réservoirs de virus sont essentiellement les bovins porteurs latents qui, suite à un élément déclencheur, permettront au virus de se réactiver et donc l'excréteront.

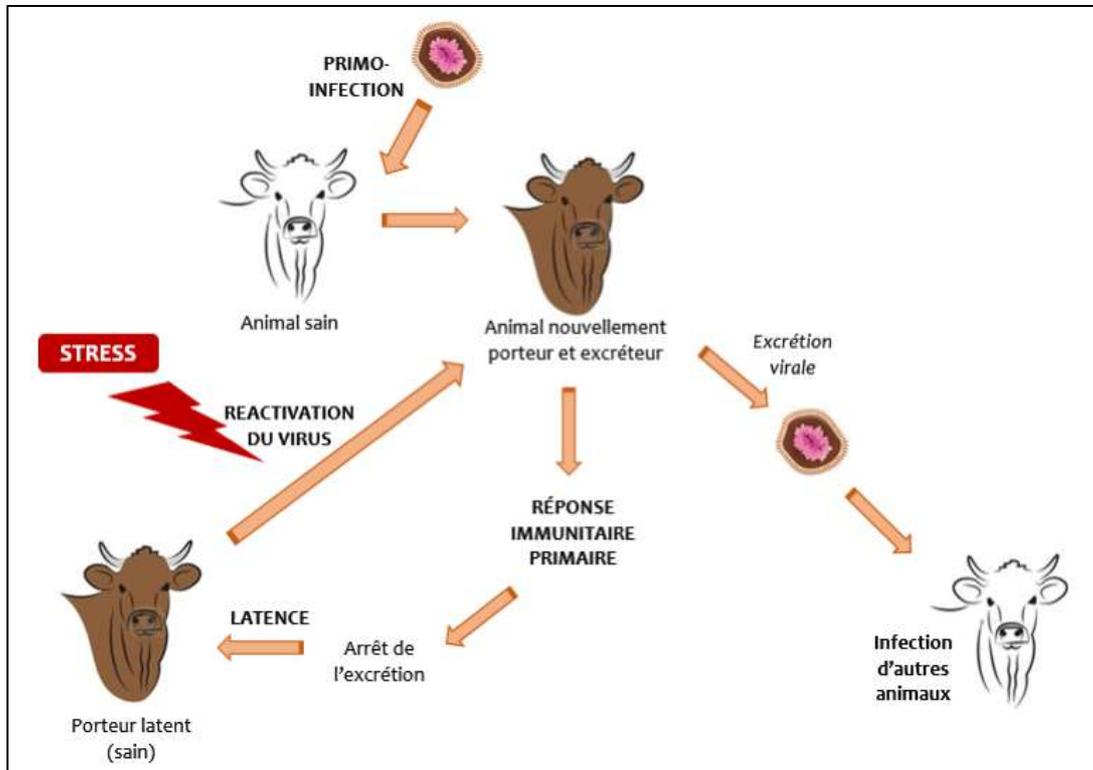


Figure 10. Pathogénie de l'infection par le BHV-1 (source personnelle)

Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'apparition et le développement de la maladie :

➤ **La saison**

Les foyers sont souvent diagnostiqués en période hivernale.

➤ **L'immunité**

L'excrétion du virus BHV1 va dépendre de l'immunité acquise de l'animal : ainsi, plus il sera immunisé contre le virus, moins il risquera d'excréter lors de stimulus. C'est également l'immunité acquise qui permettrait de diminuer l'expression de la maladie. Dans tous les cas, un veau ayant encore des anticorps maternels sera protégé de la maladie, mais pas de l'infection virale. La latence reste possible.

➤ **L'âge**

L'âge diminue la sensibilité. On constate d'ailleurs que la mortalité est plus importante chez les veaux de moins de deux semaines que chez les adultes.

➤ Les souches

Elles ne causent pas toutes la même morbidité et mortalité, à corrélérer avec l'état immunitaire des animaux.

➤ **Le stress** (transport, changement alimentaire)

Il entraîne la réactivation du virus, mais aussi une diminution des défenses. On a donc une aggravation de l'expression clinique.

➤ Les surinfections

Elles provoquent une diminution de l'immunité et accroissent donc l'expression clinique.

1.5.3.2.5. Clinique

La rhinotrachéite est la forme respiratoire de l'infection par le virus BHV-1, mais d'autres formes existent. En effet, suivant le sous-type viral et sa voie d'entrée, le virus peut aussi être à l'origine d'encéphalites, de conjonctivites, d'avortements, ou encore de formes génitales [25].

Le BHV-1 ne provoque pas de BPI au sens de la définition vue précédemment, mais une rhinotrachéite. En revanche, il favorise aussi grandement les surinfections bactériennes ou les co-infections virales, à l'origine de BPI.

La majorité des cas d'infection sont asymptomatiques. Si la forme respiratoire est déclarée, on observe en premier lieu une hyperthermie marquée (variant entre 40 et 42°C) pouvant durer 3 à 5 jours. On note également souvent de l'anorexie, de l'abattement ainsi que des signes locaux respiratoires et oculaires avec notamment un jetage nasal abondant, du ptyalisme, une toux grasse, un épiphora, une congestion des muqueuses, des dépôts spumeux autour de la bouche et des croûtes obstruant les cavités nasales.

Cette phase aiguë dure en moyenne une dizaine de jours, à l'issue desquels la guérison est souvent spontanée mais où le pronostic peut aussi être assombri par l'apparition de complications bactériennes. Ces dernières sont favorisées par l'effet cytolytique du virus sur les cellules des muqueuses nasales et trachéales et son effet immunosuppresseur.

1.5.3.3. Le parainfluenza 3

Si le virus est associé aux BPI des jeunes bovins, on estime toutefois que son pouvoir pathogène intrinsèque est peu élevé ou méconnu.

1.5.3.3.1. Taxonomie

Le virus PI-3 appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, à la sous-famille des *Paramyxovirinae* et au genre *Respirovirus*. Ce dernier est constitué par les virus PI de type 1, de type 2 et de type 3. Le type 3 est le seul à être important cliniquement chez les ruminants.

1.5.3.3.2. Caractéristiques

C'est un virus de grande taille (environ 150 à 300 nm), enveloppé, à symétrie hélicoïdale. Il possède à sa surface **2 glycoprotéines** : la protéine hémagglutinine-neuraminidase (HN) et la glycoprotéine de fusion. La HN joue plusieurs rôles tels que l'attachement à la cellule, l'acide sialique (hémagglutinine) et l'activité de clivage de cet acide sialique (neuraminidase). La glycoprotéine de fusion permet quant à elle au virus de pénétrer dans la cellule infectée.

1.5.3.3.3. Épidémiologie

Le virus est ubiquitaire et son taux d'infection est élevé ; en France sa prévalence est estimée à 65-70%.

L'infection se fait par voie respiratoire via contact mufle à mufle ou via les aérosols et les particules fines transportées par l'air. Ainsi, les veaux vont s'infecter lorsqu'ils vont partager leur volume d'air avec d'autres animaux infectés excréteurs ; c'est par exemple le cas lors de leur transport ou lors de leur allotement pour l'engraissement. La principale source de virus est le jetage et on estime qu'un veau infecté va excréter le virus pendant 8 à 10 jours.

Comme les autres virus, il est d'autant plus stable que les températures sont basses.

1.5.3.3.4. Pathogénie

Le virus se multiplie en premier lieu dans la muqueuse respiratoire. Si une virémie transitoire peut ensuite se produire, le virus a principalement un tropisme respiratoire : il se dissémine localement et va ainsi infecter les cellules épithéliales du tractus respiratoire et les macrophages alvéolaires. En se multipliant, il va induire une hyperplasie et une nécrose de la muqueuse ainsi qu'une destruction des cellules ciliées [26].

Les infections à PI3 sont très fréquentes, mais dans la majorité des cas, celles-ci n'entraînent que des signes cliniques très discrets voire totalement absents [27]. Cela confirme le fait que le rôle de Pi-3 tient plus d'agent initiateur que d'agent pathogène au sens premier ; il est donc souvent isolé et identifié de façon conjointe à d'autres virus et/ou bactéries lors de troubles respiratoires mais sa gravité est surtout imputable aux surinfections bactériennes.

1.5.3.4. Le Coronavirus bovin

1.5.3.4.1. Taxonomie

Le virus appartient à la famille des *Coronaviridae*. C'est un virus enveloppé à ARN, de grande taille (surtout pour un virus à ARN) puisque son génome va de 26 à 32 kb.

1.5.3.4.2. Caractéristiques

Initialement associé uniquement aux diarrhées néonatales du veau, le rôle du coronavirus bovin dans les affections respiratoires ne fut découvert que récemment : en effet, chez des bovins atteints de bronchopneumonies, des antigènes réagissant avec des anticorps anti-coronavirus bovins ont été identifiés au niveau des poumons et des cavités nasales. Plus tardivement, le virus fut isolé dans des prélèvements respiratoires. Aujourd'hui, bien qu'il existe plusieurs souches de coronavirus, le sérotype est le même, et aucune distinction ne peut être faite entre les virus entériques et les virus respiratoires.

1.5.3.4.3. Épidémiologie

Aucune information épidémiologique en matière d'affection respiratoire n'existe, même si la prévalence du coronavirus semble très élevée en élevage bovin (pour la partie entérique au moins) [28].

1.5.3.4.4. Clinique

L'infection respiratoire par le Coronavirus bovin provoque au niveau histologique des lésions épithéliales des cornets nasaux, de la trachée mais aussi des poumons.

Cliniquement, les troubles sont peu marqués et on va essentiellement remarquer de la toux, de la dyspnée et de l'hyperthermie allant jusque 41°C. Bien sûr, des troubles entériques peuvent être reliés en plus [29].

1.5.3.5. L'Adénovirus bovin de type 3

1.5.3.5.1. Taxonomie

Les adénovirus bovins sont des virus appartenant à la famille des *Adenoviridae* et sont divisés en deux genres au sein desquels 10 sérotypes sont répartis :

- le genre Mastadenovirus comprenant les adénovirus bovins A (type 1), B (type 3), et C (type 10)

- le genre Atadenovirus comprenant les adénovirus bovins D (types 4, 5 et 8), E (type 6) et F (type 7)

1.5.3.5.2. Caractéristiques

Tout comme les coronavirus vus précédemment, les adénovirus sont à l'origine de manifestations cliniques d'entérites et de pneumonies (souvent conjointement). Toutefois, leur implication dans les affections respiratoires a été peu étudiée [30].

1.5.3.5.3. Épidémiologie

Le virus touche essentiellement les veaux de 3 semaines à 4 mois, chez lesquels on estime la période d'incubation de 7 à 10 jours [31].

Les adénovirus sont ubiquistes ; en France notamment, la prévalence de l'adénovirus de type 3 est estimée à 75-85% [32].

Les sources de virus sont les sécrétions nasales et conjonctivales, les matières fécales et l'urine.

1.5.3.5.4. Clinique

Le tableau clinique est celui d'une pneumo-entérite. Les signes respiratoires sont les premiers à apparaître et sont légers ; on remarque du jetage séreux oculo-nasal et de la toux. Un syndrome fébrile ainsi qu'une diminution du GMQ (liée à une anorexie) sont également notés. Dans un second temps apparaissent des signes digestifs (salivation et diarrhée). Certains animaux pourront également séroconvertir mais ne présenteront aucun signe clinique ; confirmant le fait que l'Adénovirus 3 ne semble avoir qu'un rôle mineur en pathologie respiratoire.

1.5.3.6. Le BVDV

Si le virus de la diarrhée virale bovine n'est pas considéré comme un pathogène respiratoire primaire, des séroconversions envers le virus ont tout de même été mises en évidence lors de certains épisodes d'affections respiratoires ; cela nous amène à le prendre en compte dans notre liste de pathogènes respiratoires d'importance diagnostique.

1.5.3.6.1. Taxonomie

Le BVDV est un virus appartenant à la famille des *Flaviviridae*, et au genre *Pestivirus*. C'est un virus enveloppé, de petite taille, dont le génome est composé d'un ARN simple-brin de polarité positive ; il est donc fragile mais présente une grande variabilité génomique.

1.5.3.6.2. Caractéristiques

In vitro, le BVDV se scinde en 2 biotypes qu'on nomme cytopathogène (cp) et non-cytopathogène (ncp) selon la production ou non d'un effet lytique sur les cultures cellulaires. Seules des souches ncp sont isolées des poumons.

1.5.3.6.3. Épidémiologie

Le virus est ubiquitaire. En France, 60 à 80% des bovins présentent des anticorps contre le virus. Par ailleurs, selon les localisations géographiques, la prévalence des bovins séropositifs varie de 36 à 88%. La source principale de virus est l'IPI (infecté persistant immunotolérant).

Deux modes de transmission sont possibles :

- horizontale lorsque la contamination se fait par contact direct, le virus BDV pénètre alors via l'appareil respiratoire, digestif, ou la conjonctive.

- verticale lorsqu'une vache gestante s'infecte au cours de sa gestation, le virus va alors traverser la barrière placentaire et contaminer le fœtus. Ce résultat dépend du stade de gestation et des souches puisque seules les souches ncp parviennent à traverser la barrière placentaire. Si cette contamination se fait avant le 125^{ème} jour de gestation, le veau naissant sera infecté de manière persistante et sera immunotolérant (IPI) envers la souche infectante. Souvent d'apparence saine, ce veau excrètera de

façon continue le virus et pourra contaminer le reste du troupeau sans signe avant-gardiste. Notons également qu'une vache IPI donne naissance à des veaux IPI de façon systématique.

1.5.3.6.4. Pathogénie

Le virus a un tropisme cellulaire très large. Il va tout d'abord réduire l'activité des macrophages alvéolaires. De même, il va altérer la fonctionnalité des granulocytes neutrophiles ainsi que des lymphocytes B et T. Il provoque donc un état d'immunodépression transitoire facilitant le développement d'autres infections [33].

1.5.3.6.5. Clinique

Le tableau clinique va être large et très peu spécifique, on peut noter un syndrome fébrile, une anorexie, une chute de production laitière, une leucopénie, de la diarrhée, mais aussi des troubles de la reproduction et une maladie des muqueuses souvent fatale.

En matière d'affection respiratoire, le rôle du BDVD est indirect, expliquant de façon probable l'absence de tableau clinique spécifique ; son rôle est immunosuppresseur, facilitant ainsi les autres infections virales ou bactériennes.

Comme pour les autres virus décrits précédemment et dont le rôle est plutôt secondaire, les lésions pulmonaires observées s'expliquent davantage par l'action pathogène des agents bactériens en surinfection.

2. Méthodes d'identification des virus respiratoires

Les affections respiratoires touchent par définition de nombreux individus. La démarche diagnostique concerne donc un diagnostic de troupeau, ou en tout cas de lot. Il existe deux grands types de diagnostic : le diagnostic direct et le diagnostic indirect.

Par ailleurs, il est primordial de rappeler que la probabilité de détecter l'agent pathogène recherché dépend directement de la qualité de l'échantillon prélevé, définie par sa quantité ainsi que les conditions et la durée de son transport.

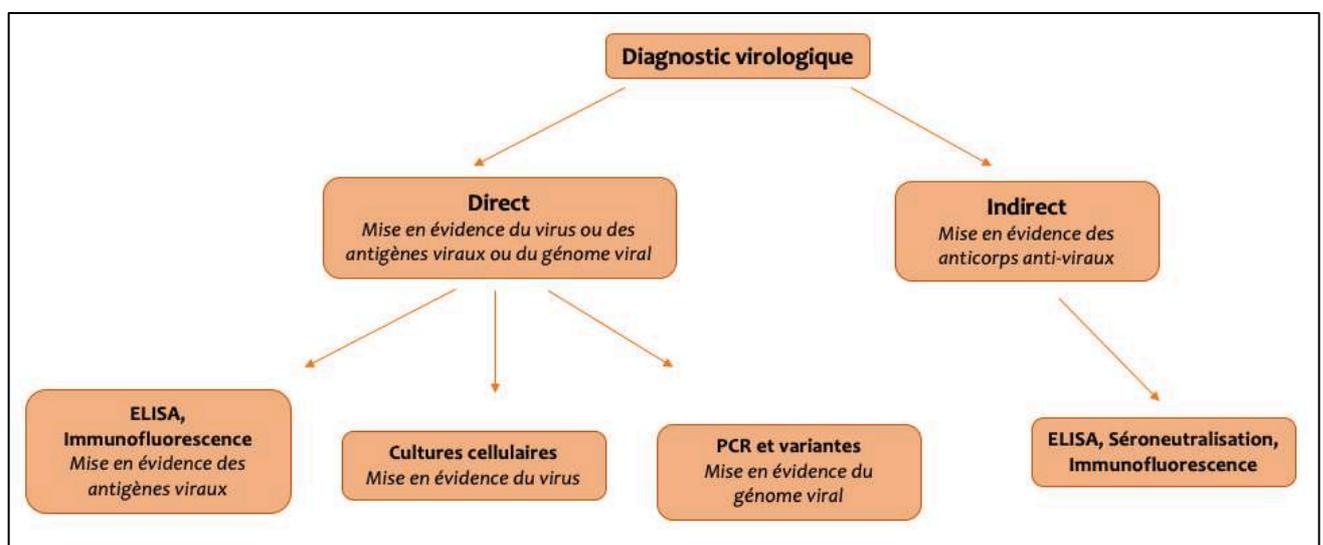


Figure 11. Méthodes d'identification des virus (schéma personnel)

Le meilleur prélèvement est souvent obtenu sur le site de la lésion et dans les premiers jours de l'apparition de celle-ci.

2.1.1. Le diagnostic indirect

Chez l'animal vivant, on va chercher à détecter, suite à une infection, des anticorps spécifiquement dirigés contre l'agent pathogène recherché (principe de la sérologie).

Cette technique présente énormément de limites puisque l'on sait que les veaux de moins de 4 mois présentent encore des anticorps colostraux ou peuvent avoir développé des anticorps induits par la vaccination, et nous ne pouvons, dans ces cas-là, pas interpréter les résultats.

Cette méthode va alors pouvoir s'utiliser au niveau de la cinétique afin de mettre en évidence une séroconversion : on réalise ainsi deux prélèvements à trois semaines d'intervalle, le premier en tout début d'infection.

Enfin, un dernier frein à la mise en œuvre de cette technique est le délai de traitement des analyses puisque l'on n'a le résultat qu'après le deuxième prélèvement. Or, en pratique courante, plus le diagnostic est établi rapidement, plus le traitement sera mis en place rapidement et plus il pourra être efficace. Ce type d'analyses n'est donc pas bien adapté aux affections respiratoires. A l'heure actuelle, les techniques utilisées sont de l'ELISA indirect et de l'immunofluorescence, dont les principes sont décrits ci-dessous.

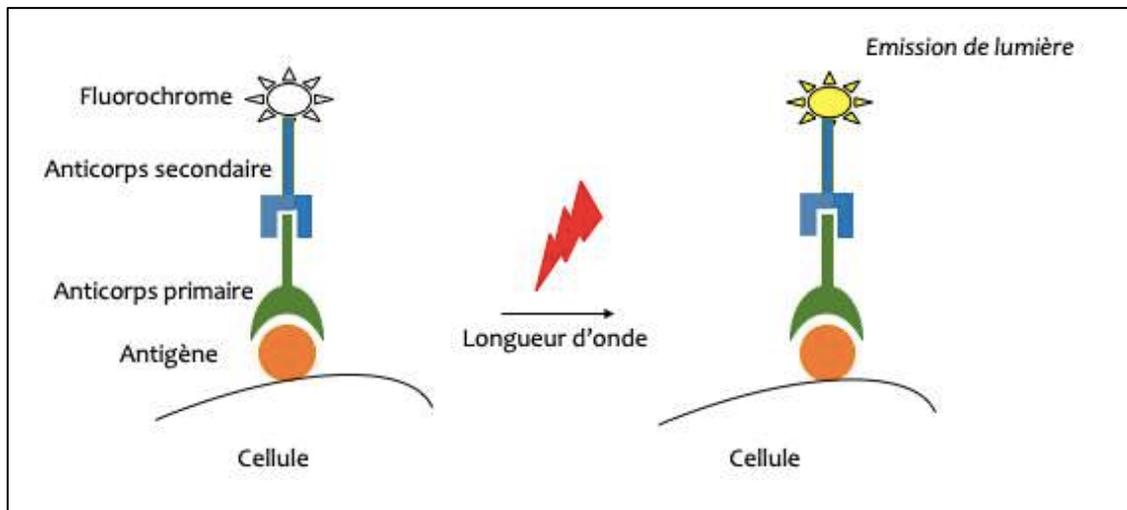


Figure 12. Principe général de l'immunofluorescence indirecte (schéma personnel)

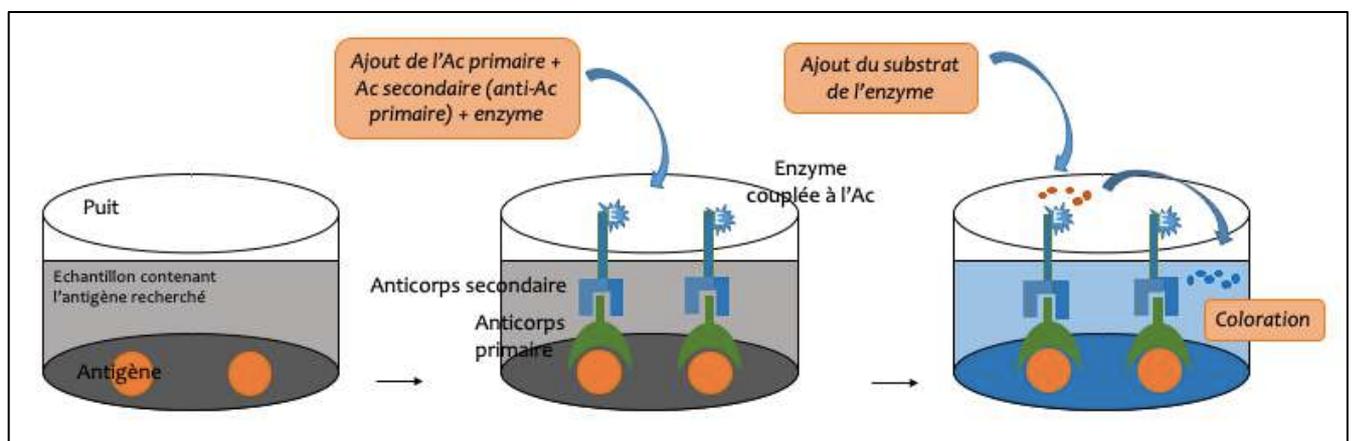


Figure 13. Principe général de l'ELISA indirect (schéma personnel)

2.1.2. Le diagnostic direct

Contrairement au diagnostic indirect qui vise à détecter des traces de l'infection, le diagnostic direct va directement mettre en évidence l'agent pathogène. On peut différencier trois grands principes de diagnostics directs.

Cela peut s'effectuer par culture, par recherche d'antigènes, ou par recherche d'acides nucléiques.

2.1.2.1. Isolement des virus en cultures cellulaires

La culture des virus est intéressante puisqu'elle permet non seulement l'isolement viral et donc le diagnostic, mais elle contribue aussi à la production virale (réactifs, vaccins) et aux études fondamentales.

Cette technique de laboratoire est basée sur un principe de réplication du virus : on parle aussi d'**isolement viral en culture cellulaire**. Il est important de se rappeler qu'il n'y a pas de cellule unique permettant à tous les virus de se multiplier. En effet, les virus ont d'une part une spécificité d'hôte et d'autre part, certains virus ne sont pas cultivables car ils ne parviennent pas à se multiplier en culture cellulaire *in vitro*. Ainsi, afin d'affiner le diagnostic, il sera nécessaire d'inoculer l'échantillon pathologique sur plusieurs lignées cellulaires (en général 2 ou 3), choisies spécifiquement selon le virus recherché.

En pratique, l'échantillon est introduit sur le tapis de cellules. On va alors chercher par la suite à détecter des lésions cellulaires appelées au sens large « **effet cytopathogène** » (ECP) ; plus précisément, l'ECP est l'ensemble des altérations cytologiques que l'on peut observer lors de la multiplication virale. En effet, la multiplication du virus va utiliser la plus grande partie des ressources de la cellule, qui sera alors très impactée, *et ce spécifiquement à chaque virus* ; l'ECP va donc dépendre du type cellulaire en culture et du virus qui s'y multiplie.

Sans ECP, d'autres outils biologiques sont disponibles pour détecter la présence du virus dans les cellules mises en culture.

Cette méthode présente quelques inconvénients ; elle implique que le prélèvement initial soit de qualité (comme dit précédemment), puisque la présence des cellules infectées et leur intégrité conditionnent le résultat de l'isolement. On estime que

la culture virale est plus contraignante que les autres techniques avec des températures à respecter selon la durée de transport [34] :

- transport de plus d'une heure : 4°C (prélèvements autre que sang)
- transport de + de 24h : -70°C

Elle impose également un temps long avant d'obtenir un diagnostic : la multiplication du virus va impliquer plusieurs cycles de réplication et donc ne sera complète qu'après quelques jours voire quelques semaines, ce qui peut être un **frein** en cas d'affection respiratoire puisque plus le diagnostic est rapide, plus le traitement sera mis en place tôt et donc sera efficace.

Enfin, certains virus, comme le VRSB, sont très fragiles et perdent très rapidement leur infectivité. Ils ne sont donc pas des bons candidats à l'isolement viral.

En pratique, cette méthode ne fonctionne que pour détecter l'IBR, c'est infaisable pour le VRSB qui est très fragile et perd donc son pouvoir infectieux. Pour les autres virus, c'est trop compliqué et ils sont également trop fragiles donc la méthode perd trop de sensibilité. Par exemple, pour le coronavirus, une seule lignée cellulaire est disponible pour les isoler, donc c'est trop restrictif.

2.1.2.2. Recherche d'antigènes

L'identification directe est basée sur le principe de la révélation de la réaction antigène/anticorps. Cette technique tire ses avantages de sa rapidité mais aussi de sa capacité à détecter des virus pour lesquels la culture cellulaire est impossible.

2.1.2.2.1. ELISA direct

L'ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique qui permet de détecter une réaction Ag/Ac via une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps, sur un substrat.

Elle est basée sur la caractéristique de certains plastiques à adsorber de façon stable l'Ag ou l'Ac (monoclonal). Après adsorption de notre réactif, des marqueurs enzymatiques sont utilisés pour révéler la réaction Ag/Ac. Ce marqueur enzymatique peut être porté par l'Ag ou l'Ac (selon ce qui a été adsorbé au début).

Le système enzymatique utilisé est en général soit la peroxydase, qui est peu stable et dont le substrat est le TMB ou l'OPD, soit la phosphatase alcaline (PAL) dont le substrat est le NAPD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate).

Les avantages de cette technique sont avant tout sa rapidité (2h30 en moyenne), mais aussi sa sensibilité (par l'utilisation d'anticorps monoclonaux) et sa facilité avec les nombreuses trousse que l'on peut trouver dans le commerce.

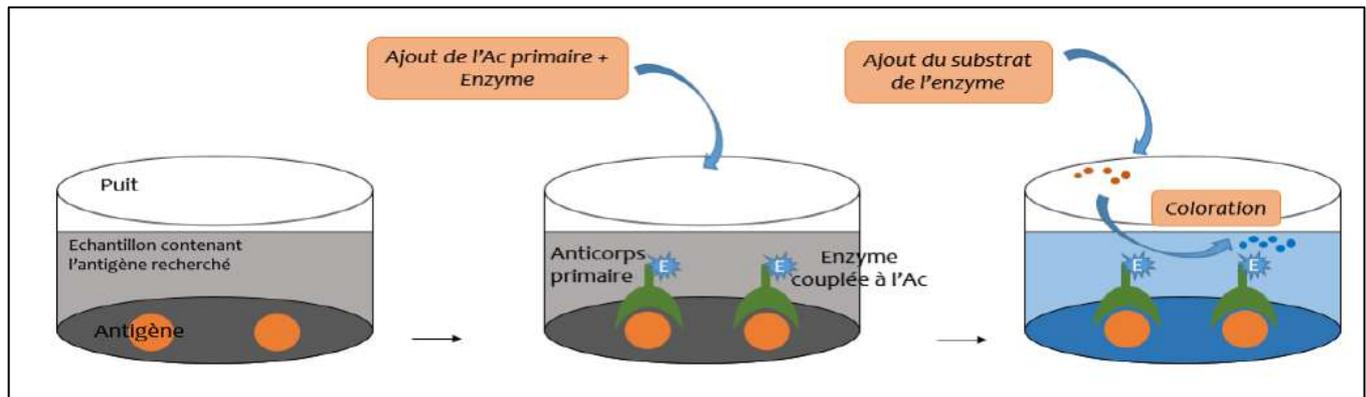


Figure 14. Principe de l'ELISA direct (schéma personnel)

2.1.2.2.2. Immunofluorescence directe

Sa première utilisation date de 1956 et a permis l'identification du virus de la grippe dans des cellules épithéliales.

Comme les techniques précédentes, celle-ci se base sur la reconnaissance du complexe antigène-anticorps, la seule différence se trouve au niveau de la révélation et de la lecture des résultats ; si l'ELISA utilise une méthode de colorimétrie, l'immunofluorescence utilise, elle, une méthode de fluorescence.

La technique consiste à rechercher des **antigènes viraux** dans des cellules infectées, grâce à des **anticorps** (monoclonaux, dirigés contre le virus recherché) marqués par une **protéine fluorescente**, appelée *fluorochrome* (isothiocyanate de fluorescéine, rhodamine).

Ce fluorochrome va émettre de la lumière lorsqu'il sera exposé à une certaine longueur d'onde. Si l'antigène n'est pas présent, les anticorps ne peuvent pas se fixer et il n'y a donc pas émission de lumière. En revanche, si l'antigène est présent, il y a

formation de complexes immuns, qui seront alors révélés par lecture au microscope à fluorescence.

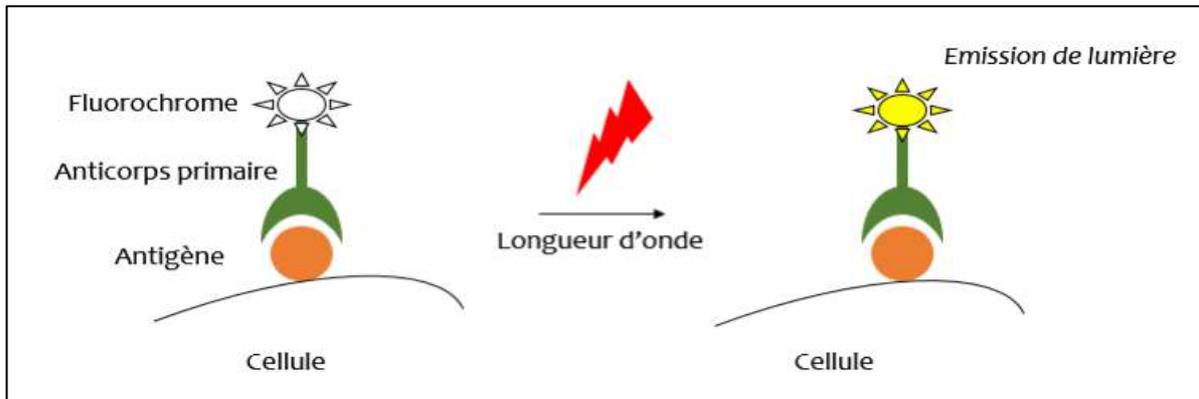


Figure 15. Principe de l'immunofluorescence directe (schéma personnel)

2.1.2.3. Recherche des acides nucléiques

2.1.2.3.1. PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire permettant l'amplification de séquences d'ADN *in vitro*, par répétition en grand nombre d'une séquence d'acides nucléiques connue, donnant alors plusieurs copies quantifiables et de nombre 2^n , où n = nombre de cycles. Cette amplification se fait grâce à une ADN polymérase et des amorces nucléotidiques spécifiques [35].

Le cycle comporte toujours les 3 mêmes étapes, qui vont se répéter :

1. Dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée
2. Hybridation d'amorces complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible
3. Réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) à partir des oligonucléotides

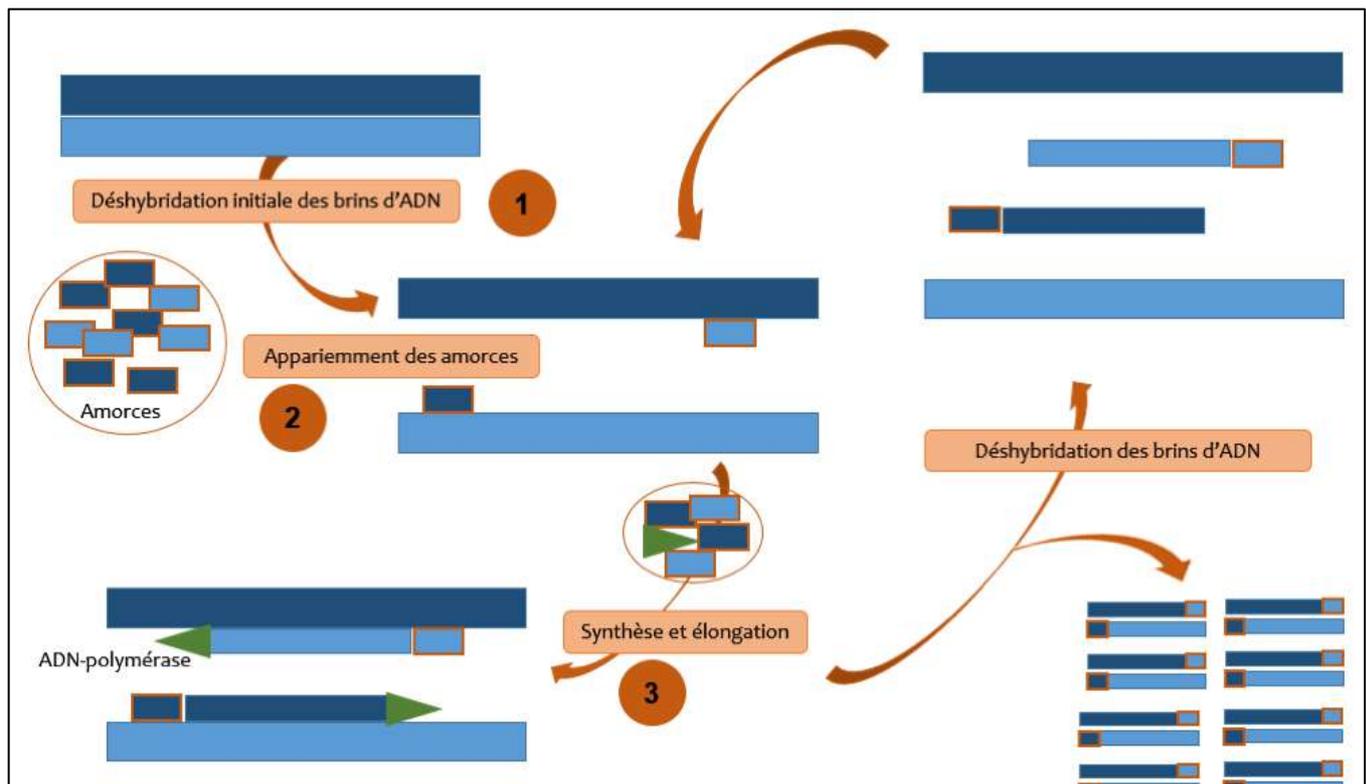


Figure 16. Principe général de la PCR (*schéma personnel*)

Cette méthode permet un diagnostic plus rapide et plus efficace d'infections causées par des micro-organismes pour lesquels la culture peut être difficile, voire impossible. De même, elle permet de travailler sur des quantités très infimes d'acides nucléiques pour lesquelles les hybridations moléculaires « classiques » (Northern Blot et Southern Blot) ne seraient pas assez sensibles [36].

Ainsi, la PCR a un intérêt très marqué et est la plus utilisée aujourd'hui. Elle présente tout de même quelques inconvénients ; elle augmente le risque de contamination entre 2 échantillons différents, du fait de sa sensibilité importante mais elle expose également au risque de ne pas prendre en compte les variantes génétiques d'un virus du fait de sa grande spécificité. Enfin, elle ne révèle pas non plus le caractère infectieux du pathogène.

2.1.2.3.2. RT-PCR

Dérivée de la PCR, la RT-PCR (pour Reverse Transcriptase PCR) est une technique permettant la détection d'un ARNm rare présent dans un organe, un tissu ou encore une cellule.

Le principe consiste à copier les ARN totaux étudiés en ADNc simple brin, par action de la transcriptase inverse. Les molécules d'ADN obtenues vont alors jouer le rôle de matrice pour une réaction PCR qui utilise un couple d'amorces spécifiques de la séquence de l'ARN initial qui nous intéresse, comme décrit précédemment [36].

2.1.2.3.3. q-PCR

La q-PCR, ou PCR, ou PCR en temps réel, est une technique de PCR qui permet, en plus, de mesurer la quantité initiale d'ADN en continu, en mesurant la quantité d'amplicons (portions d'ADN définie par un couple d'amorces). Elle apporte ainsi plus de spécificité et sensibilité à la technique initiale.

Plusieurs méthodes de q-PCR existent, mais le principe général est toujours le même. Plus précisément, la PCR en temps réel s'appuie sur la détection et la quantification d'une molécule fluorescente dite « reporter » : quand le signal fluorescent augmente, cela signifie que la quantité d'amplicons augmente. Ainsi, en effectuant un suivi de la fluorescence émise pendant la réaction, il nous est possible de suivre la quantité d'amplicons présente dans la réaction « en temps réel ».

L'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. A chaque cycle, elle est proportionnelle à la concentration d'amplicons de départ, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base. (81)

On décrit par exemple la méthode « Taqman », qui comprend les deux amorces spécifiques du segment à amplifier et une sonde d'hydrolyse. Ces sondes Taqman sont des sondes d'hydrolyse qui permettent d'augmenter considérablement la spécificité des techniques de q-PCR.

Le principe est basé sur l'activité exonucléasique 5'-3' de la Taq-polymérase. Celle-ci clive une sonde marquée lors de son hybridation à la séquence complémentaire, libérant ainsi un fluorochrome extincteur (qui empêche le fluorochrome d'émettre de la fluorescence lorsqu'il est excité) en 5' et un émetteur en 3'. Le fluorochrome n'est alors plus « éteint » par l'extincteur, permettant l'émission d'une fluorescence. C'est donc, comme vu précédemment, ce signal fluorescent qui permet de mesurer quantitativement l'accumulation des produits PCR.

La spécificité est augmentée car en plus des deux amorces spécifiques de la PCR, la sonde elle aussi spécifique d'un autre fragment d'ADN est ajoutée. La sensibilité est augmentée car la fluorescence émise est strictement proportionnelle au nombre de copies produites au cours de la PCR.

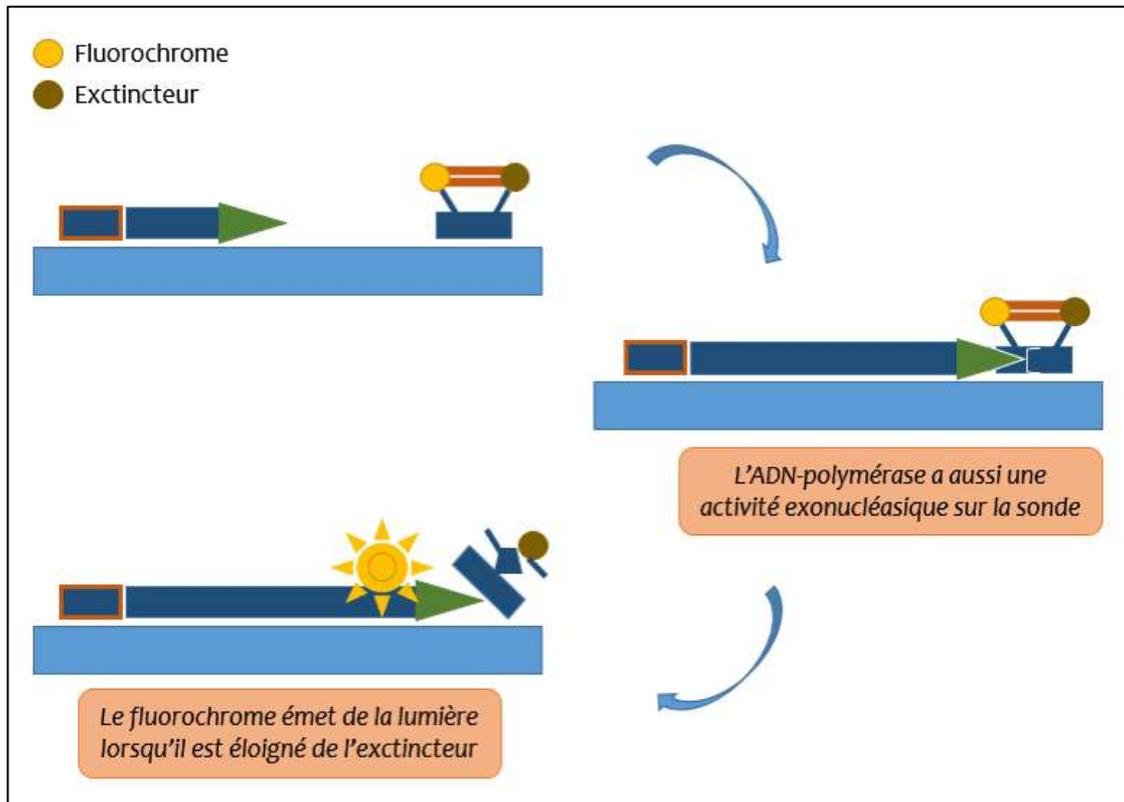


Figure 17. Principe de la PCR en temps réel (*schéma personnel*)

La **fluorescence** est exprimée en fonction du **nombre de cycles d'amplification**. L'augmentation exponentielle du produit est limitée : la multiplication atteint forcément un plateau. La PCR en temps réel permet ainsi la quantification durant la phase exponentielle de l'amplification.

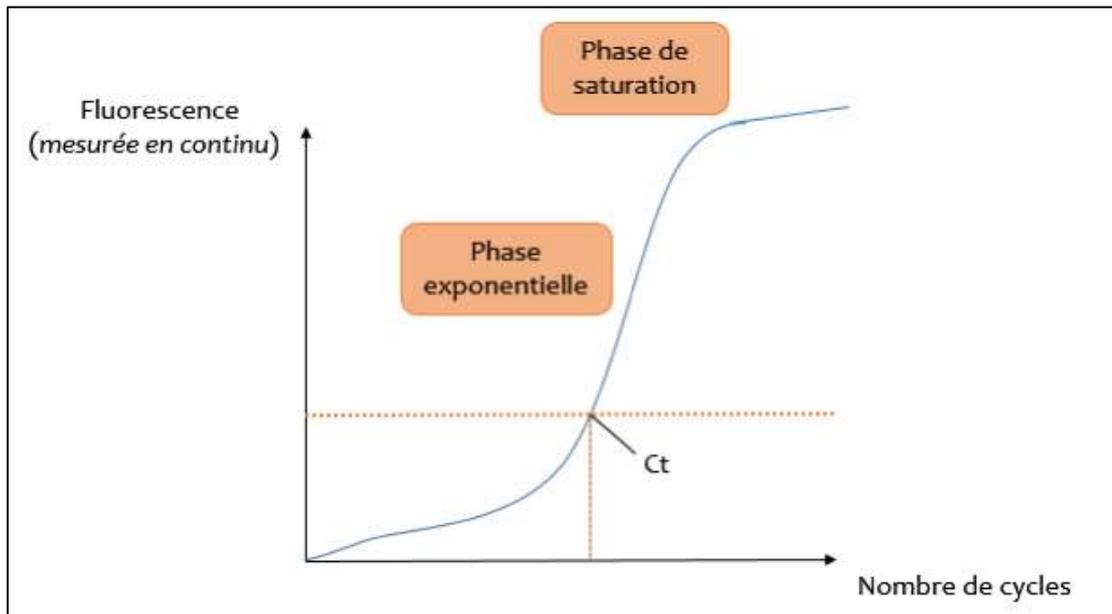


Figure 18. Représentation graphique d'amplification d'ADN par q-PCR (*schéma personnel*)

Le **cycle seuil** (Ct ou threshold line) est une valeur de fluorescence qui sert de référence à tout moment, et à laquelle les courbes sont comparées. C'est donc le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence atteint le seuil référence. Ce Ct est fortement corrélé avec le nombre de copies initial dans l'échantillon puisque plus il y en a, plus la fluorescence apparaît tôt.

2.1.2.3.4. PCR multiplex

Le principal inconvénient de la PCR est que cette technique est un diagnostic orienté ; on ne recherche qu'un pathogène précis, il faut donc pouvoir le suspecter initialement.

L'objectif de la PCR Multiplex est de rechercher :

- des agents pathogènes de structure génomique proche en amplifiant une séquence suffisamment conservée commune aux différents virus recherchés (*par exemple des virus d'une même famille au sens large*).
- des agents pathogènes éloignés mais qui vont provoquer des infections au sein du même organe. Dans ce cas, on utilise des systèmes d'amorces spécifiques pour chaque germe.

Pour les affections respiratoires des bovins, des kits de PCR multiplex existent et permettent de rechercher en une seule analyse un grand nombre de virus (RSV, Pi3, BVD, Coronavirus) et de bactéries (*M. haemolytica*, *P. multocida*, *M. bovis*, *H. somni*).

Quatre kits différents ont été utilisés : le bio-T® kit Coronavirus bovin et Influenza D, le bio-T® kit *Mycoplasma bovis* et *Histophilus Somni*, le bio-T® kit *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* et le bio-T® kit BoRSV et Pi3.

Tous ces kits permettent la détection des 8 pathogènes majeurs des affections respiratoires des bovins, par RT-PCR en temps réel avec contrôle positif interne endogène (IPC), et ce, à partir d'une même extraction et d'un protocole commun d'amplification PCR. Les étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qPCR sont détaillées dans le manuel d'utilisation des kits, conformément aux instructions du fabricant.

Nous détaillerons cependant l'interprétation des résultats après lecture des échantillons, car celle-ci doit être minutieuse et doit prendre en compte les caractéristiques épidémiologiques des pathogènes (vues précédemment) :

Pour le bio-T® kit *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*, les résultats obtenus sur prélèvement de type ENP doivent être interprétés selon le niveau de positivité obtenu, du fait de la présence naturelle de *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* au niveau de l'appareil respiratoire supérieur. Le risque de positivité liée à une contamination naturelle de l'écouvillon est fort, limitant de fait la valeur diagnostique prédictive positive du test de détection sur ENP.

<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>	IPC endogène	Interprétation
Neg	Neg	Pos Ct < 35	Négatif ou Non détecté
Pos Ct < 35	Pos		Positif ou détecté Pour <i>P. multocida</i> , un résultat positif (pour toute valeur de Ct) n'a aucune valeur prédictive positive significative dans la mesure où elle est aussi détectée avec la même prévalence sur ENP de veaux sains cliniquement)
Pos Ct > 35	Pos		Positif ou détecté Pour <i>M. haemolytica</i> , naturellement présente au niveau de la trachée, une valeur de Ct > 35 n'a pas de valeur prédictive positive significative car aussi observée chez veaux sains
Pos	Pos	Neg ou Ct > 35	Positif ou détecté
Neg	Neg	Neg ou Ct > 35	Ininterprétable (problème lors de l'extraction, inhibiteurs dans l'échantillon, problème de prélèvement avec une quantité de cellules insuffisante...)

Tableau 2. Différents résultats obtenus pour les échantillons (ENP), kit 1 (d'après le manuel d'utilisation Bio-sella)

Pour le bio-T® kit BoRSV et Pi3, pour les échantillons d'ENP, la vaccination intranasale des animaux par un vaccin bivalent BoRSV et Pi3 peut être à l'origine d'un résultat doublement positif BoRSV et Pi3 en qRT-PCR si le prélèvement est réalisé dans les 15 jours post-vaccination.

BoRSV	Pi3	IPC endogène	Interprétation
Neg Ct > 40	Neg Ct > 40	Pos Ct < 35	Négatif ou Non détecté
Pos Ct < 40	Pos Ct < 40		Positif ou détecté
Pos Ct < 40	Pos Ct < 40	Neg ou Ct > 35	Positif ou détecté
Neg Ct > 40	Neg Ct > 40	Neg ou Ct > 35	Ininterprétable (problème lors de l'extraction, inhibiteurs dans l'échantillon, problème de prélèvement avec une quantité de cellules insuffisante...)

Tableau 3. Différents résultats obtenus pour les échantillons (ENP), kit 2 (d'après le manuel d'utilisation Bio-sellal)

Pour le bio-T® kit Coronavirus bovin et Influenza D :

Coronavirus	IDV	IPC endogène	Interprétation
Neg Ct > 40	Neg Ct > 40	Pos Ct < 35	Négatif ou Non détecté
Pos Ct < 40	Pos Ct < 40		Positif ou détecté
Pos Ct < 40	Pos Ct < 40	Neg ou Ct > 35	Positif ou détecté
Neg Ct > 40	Neg Ct > 40	Neg ou Ct > 35	Ininterprétable (problème lors de l'extraction, inhibiteurs dans l'échantillon, problème de prélèvement avec une quantité de cellules insuffisante...)

Tableau 4. Différents résultats obtenus pour les échantillons (ENP), kit 3 (d'après le manuel d'utilisation Bio-sellal)

Pour le bio-T® kit *Mycoplasma bovis* et *Histophilus Somni*, comme dit précédemment, les résultats obtenus sur les ENP doivent être interprétés selon le niveau de positivité obtenu du fait de la présence naturelle de *Histophilus Somni* au niveau de l'appareil respiratoire supérieur. En parallèle, il est difficile de détecter *Mycoplasma bovis* à partir d'ENP en raison de sa localisation préférentielle dans les macrophages

pulmonaires. Un résultat négatif pour cette valence aura donc une faible valeur prédictive négative.

<i>M. bovis</i>	<i>H. somni</i>	IPC endogène	Interprétation
Neg	Neg	Pos Ct < 35	Négatif ou Non détecté
Pos	Pos Ct < 35		Positif ou détecté
Pos	Pos		Positif ou détecté Pour <i>H. somni</i> naturellement présente au niveau de la trachée, une valeur de Ct > 35 n'a pas de valeur prédictive positive significative car aussi observée chez veaux sains
Pos	Pos	Neg ou Ct > 35	Positif ou détecté
Neg	Neg	Neg ou Ct > 35	Ininterprétable (problème lors de l'extraction, inhibiteurs dans l'échantillon, problème de prélèvement avec une quantité de cellules insuffisante...)

Tableau 5. Différents résultats obtenus pour les échantillons (ENP), kit 4 (d'après le manuel d'utilisation Biosella)

3. Les virus Influenza

3.1. Présentation générale

3.1.1. Terminologie

Le mot « Influenza » viendrait, selon certains, de l'italien « Influenza di freddo » qui signifie « influence du froid » et fait référence au caractère saisonnier de la maladie, et notamment son caractère plutôt hivernal.

Le mot serait apparu en premier lieu en Angleterre au XVIII^{ème} siècle, faisant suite à une importante épidémie de grippe. D'ailleurs, le mot grippe qui signifie « saisir » relate le caractère imprévisible et soudain de la maladie, qu'on retrouve d'ailleurs encore dans l'expression « prendre en grippe ».

3.1.2. Historique

Depuis l'Antiquité déjà, les maladies infectieuses sont connues et à l'origine de grandes épidémies dans l'histoire de l'Homme. Au fil du temps, l'Homme est parvenu à préciser quels agents étaient responsables de ces épidémies et grâce à l'observation microscopique, la notion de « micro-organisme » fut mise en évidence. Les premiers virus à être découverts furent le virus de la mosaïque du tabac (en 1892) ainsi que les virus de la myxomatose (en 1898) et de la peste aviaire, et enfin le virus de la rage chez l'homme (en 1885) [37].

La grippe était alors également une maladie connue, puisqu'elle fut responsable de véritables pandémies au XX^{ème} siècle ; notamment la grippe espagnole, pandémie de 1918 absolument dramatique. Ces épidémies ont permis de faire avancer les recherches quant aux virus Influenza mais historiquement, l'interprétation de ces données était soumise à un biais, car les syndromes grippaux étaient également composés des symptômes de nombreuses autres maladies, comme le choléra ou encore le typhus. Ce n'est qu'en **1931** que l'agent pathogène de la grippe fut isolé par Richard Schope ; ce fut le premier isolement d'un virus Influenza, réalisé chez le porc.

Chez l'homme, l'épidémie de 1936 a permis d'isoler le virus Influenza A (IAV). De même, en 1940, le virus Influenza B (IBV) fut isolé par l'équipe de Francis et coll. Avant cela, des liens entre les gripes chez l'animal et les gripes chez l'homme avaient déjà été notés mais on attribuait, à tort, ces maladies à des bactéries. L'agent

de la grippe aviaire hautement pathogène (GAHP) fut décrit à la fin du 19^{ème} siècle mais ne fut pas identifié comme un virus Influenza avant 1955 [38].

Pandémie	Date	Décès	Sous-Type
Grippe espagnole	1918-1919	50 à 100 millions	H1N1
Grippe asiatique	1957	1 à 1,5 millions	H2N2
Grippe de Hong-Kong	1968	34000 (US)	H3N2
Grippe russe Ré-émergence du virus H1N1	1977		H1N1

Tableau 6. Les grandes pandémies de grippe du 20^{ème} siècle

3.1.3. Taxonomie et classification

Les virus sont des agents biologiques qualifiés de **parasites obligatoires** car ils doivent infecter une cellule vivante dite « **cellule hôte** » afin de se multiplier. Lorsqu'ils sont à l'état libre, ils sont qualifiés de « virions ».

Les virus peuvent se présenter sous des formes variées pour plusieurs raisons ; premièrement l'un des deux brins d'ADN dans lesquels ils conservent leur information génétique est redondant, par ailleurs, ils peuvent avoir des génomes à simple ou double brin, et enfin, le génome de certains virus est formé d'ARN et non pas d'ADN. L'ARN est présent dans les cellules en tant qu'intermédiaire lorsque les gènes sont traduits en protéines. Le génome des virus à ARN peut être codé dans deux directions différentes : soit les gènes sont stockés dans la direction 5'→3' ; on parle alors de **polarité positive**, soit ils sont stockés dans la direction opposée et on parle alors de **polarité négative**.

La taxonomie des virus se fait de la même façon que celle des autres organismes cellulaires, à savoir :

Ordre (-*virales*) > Famille (-*viridae*) > Sous-Famille (-*virinae*) > Genre (-*virus*) > Espèce

Leur classification évolue constamment et est gérée par l'ICTV (International Comity for Virus Taxonomy). Celle-ci se fait selon plusieurs critères :

- **des critères majeurs** tels que le type et l'organisation du génome viral, la stratégie de réplication du virus mais aussi la structure du virion

- **des critères mineurs** comme le spectre d'hôte, le tropisme et pathogénicité du virus ainsi que ses propriétés et son mode de transmission

Nous pouvons citer la classification de David Baltimore modifiée en 1971 qui permet de diviser le règne des virus en 7 groupes selon le type de génome des virus.

On retrouve d'abord les virus à ADN soit à double brin (groupe I) soit à simple brin (groupe II), puis les virus à ARN, soit à double brin (groupe III), soit à simple brin et on distingue alors ceux de polarité négative (groupe V) et positive (groupe IV) (*voir annexes*).

Enfin, on retrouve deux derniers groupes (VI et VII) constitués par les virus à ADN ou à ARN à transcription inverse.

Ces groupes sont eux-mêmes subdivisés en plusieurs familles. **Les virus Influenza appartiennent au groupe IV et sont donc à polarité négative** : autrement dit le génome de ces virus se présente sous la forme de plusieurs brins d'ARN qui doivent d'abord être transcrits en brin complémentaire dans la cellule cible pour être traduits. Ils appartiennent plus particulièrement à la famille des orthomyxoviridae. Ils sont semblables aux paramyxovirus (groupe V également mais non segmentés) de par la forme des virions, mais aussi par leur capacité à agglutiner les globules rouges.

La famille des **Orthomyxovirus** est composée du genre Influenza, mais aussi du genre Thogotovirus et Isavirus. Le genre *Isavirus* (infectious salmon anemia virus) regroupe des virus qui infectent notamment les saumons, et les virus appartenant au genre Thogotovirus infectent notamment des moustiques et des parasites du poisson. Le genre Influenza est lui divisé en plusieurs types : type A, type B, et type C [39].

Ces virus ont tous **une même nomenclature concernant leur souche** ; cela a été développé dans le but de pouvoir évaluer de façon plus simple le risque représenté par l'émergence de nouveaux variants de virus. Cette nomenclature permet aussi de pouvoir déterminer l'immunité des troupeaux ou des populations contre les précédentes souches circulantes afin que les vaccins puissent être lancés. Elle inclut le type de virus ; mais aussi l'espèce à partir de laquelle il a été isolé (si non humain) ; l'origine

géographique, le numéro d'isolement ; l'année d'échantillonnage ; et, pour les virus Influenza A uniquement, les sous-types HA et NA. Par exemple, une souche isolée chez le cheval à Prague en 1956 sera désignée ainsi : A/equine/Prague/1/56 (H7N7). Par convention, aucune espèce-hôte n'est indiquée lorsqu'il s'agit d'une souche isolée initialement chez l'homme, par exemple : A/Paris/908/97 (H3N2).

3.2. Propriétés structurales

3.2.1. Morphologie générale

Les virions sont pléomorphes, filamenteux mais deviennent sphériques in vitro. Leur taille va de 80 jusqu'à 100nm de diamètre. Ils sont composés d'un **noyau central dense d'ARN** divisés en huit (IAV, IBV et Isavirus), sept (ICV) ou six (Thogotovirus) segments hélicoïdaux symétriques, de polarité négative. Le génome mesure de 10 à 14,6 kb en tout.

Leur noyau d'ARN est entouré d'une **enveloppe lipidique** constituée de glycoprotéines. Sur cette enveloppe, on trouve 2 types de glycoprotéines de surface pour IAV et IAB ; homo-trimères de l'hémagglutinine (HA) et hétérotétramères de la neuraminidase (NA).

En microscopie électronique, il est pratiquement impossible de distinguer l'IAV et l'IBV. Ils ont une forme sphérique ou filamenteuse ; respectivement de l'ordre de 100 nm de diamètre ou dépassant souvent 300 nm de long. Les virions de l'ICV sont, eux, structurellement distincts de ceux des IAV et IBV ; car à la surface des cellules infectées, ils peuvent former de longues structures en cordon de l'ordre de 500 µm.

Cependant, ils sont similaires sur le plan de la composition, avec une enveloppe lipidique parsemée de glycoprotéines qui recouvrent à la fois une matrice protéique et le complexe protéine-ARN, appelé ribonucléoprotéine (RNP). Ce complexe RNP permet la réalisation des étapes de transcription et de réplication du virus, permettant ainsi l'amplification du matériel génétique du virus Influenza. Enfin, pour l'ICV, on trouve un seul type de glycoprotéine à savoir une hémagglutinine/estérase multifonctionnelle (HEF).

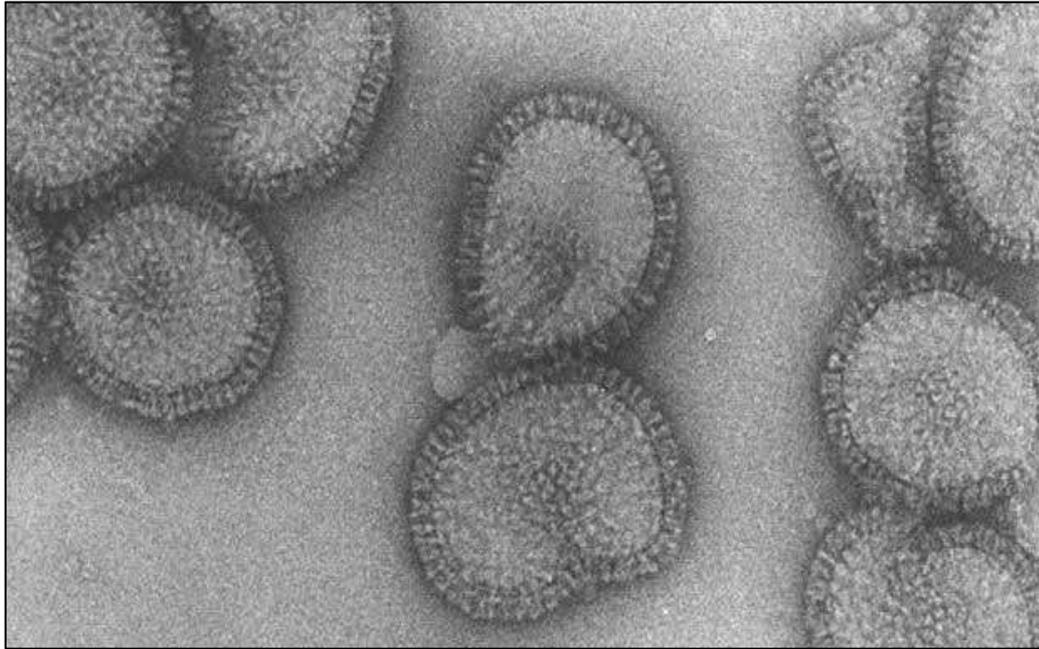


Figure 19. Virus Influenza A en microscopie électronique (d'après Internet)

3.2.2. Protéines virales

Les protéines constitutives des virions sont des **protéines structurales** alors que les protéines produites pendant l'infection, ne sont pas incorporées dans les nouvelles particules virales en cours d'assemblage et sont donc des **protéines non-structurales** qui jouent un rôle dans la réplication virale.

Les virus Influenza étant des virus enveloppés, les protéines structurales prédominantes sont des **glycoprotéines**, des protéines membranaires intégrales de type I situées à la surface de l'enveloppe et consistant en des **spicules** (petites « épines ») **glycoprotéiques**. Les lipides de l'enveloppe ont, eux, la même composition que les lipides des membranes cellulaires.

Le type (A, B ou C) est déterminé par les protéines NP, M1 et M2 tandis que le sous-type est déterminé par les protéines HA et NA.

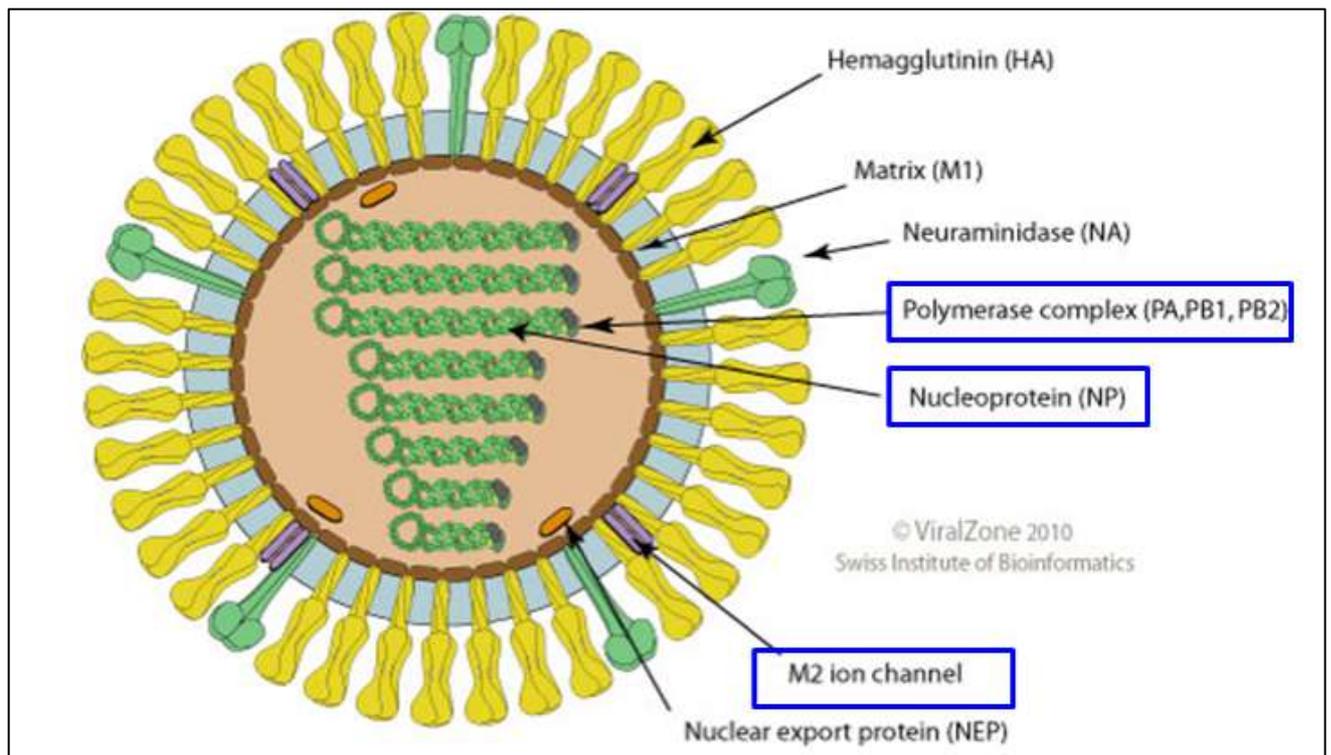


Figure 20. Morphologie générale des virus Influenza (d'après <https://viralzone.expasy.org>)

L'enveloppe de **l'IAV** est constituée de **pics de glycoprotéines de deux types** ; les unes capables de se fixer sur des récepteurs cellulaires et ainsi d'agglutiner certaines cellules libres comme les globules rouges (**hémagglutinine HA**), les autres possédant une activité enzymatique (**neuraminidase NA**), dans un rapport d'environ quatre pour un, ces pics dépassant de la membrane lipidique [40]. Sur le plan structural, l'HA est un trimère constitué de 2 régions distinctes : d'une part, une tige comprenant un enroulement hélicoïdal enroulé à trois brins et d'autre part, une tête globulaire de feuille bêta antiparallèle placée au sommet de la tige [41]. **Cette tête contient le site de liaison au récepteur de l'acide sialique**, ainsi que les déterminants antigéniques variables, nommés différemment selon les sous types.

De même, la structure tridimensionnelle de la NA est un tétramère en forme de champignon, inséré dans l'enveloppe virale via un domaine transmembranaire [42]. Son rôle est de rompre les liaisons acide sialique – HA par clivage entre les résidus d'acide sialique terminaux et les glycoprotéines et gangliosides de surface cellulaire. Cette coupure permet alors la libération des virions (sinon ils restent attachés à la

cellule hôte au niveau de l'acide sialique) mais aussi de séparer les nouveaux virions entre eux lors de la sortie, augmentant ainsi l'infectivité. Enfin, le mucus de l'épithélium respiratoire est très riche en acides sialiques, leurrant ainsi les HA qui s'y attachent lors du passage des virus ; les NA permettent alors de les en séparer. On pense également qu'elle contribue à l'infectivité du virus en décomposant les mucines dans les sécrétions des voies respiratoires et en permettant au virus de pénétrer dans l'épithélium respiratoire.

L'HA et la NA ont donc un rôle crucial dans le cycle de réplication du virus. L'hémagglutinine intervient dans la reconnaissance et l'adsorption du virus à son récepteur cellulaire qui est l'acide sialique (N-acétyl-neuraminique). La neuraminidase, quant à elle, agit plus tardivement dans le cycle de réplication du virus. Elle est impliquée dans la libération des virions néosynthétisés par hydrolyse de la liaison acide sialique – membrane cellulaire.

On trouve également des **canaux ioniques matriciels (M2)** qui traversent l'enveloppe lipidique, au nombre d'environ un canal M2 pour 101-102 molécules HA [43]. L'enveloppe et ses trois protéines membranaires intégrales HA, NA et M2 recouvrent une **matrice de la protéine M1, correspondant au noyau du virion.**

Le noyau viral est composé de la **protéine d'exportation nucléaire (NEP)** aussi qualifiée de protéine non structurale 2, **NS2**) et du **complexe ribonucléoprotéine (RNP)**, qui se compose des segments d'ARN viral enrobés de nucléoprotéine (NP) et de l'ARN polymérase hétérotrimérique ARN dépendante. Cette dernière est constituée de deux sous-unités « polymérase basique » et une « polymérase acide » (**PB1, PB2 et PA**).

L'organisation du virion de l'influenza B est similaire, avec quatre protéines d'enveloppe : **HA, NA** et, au lieu de **M2, NB et BM2**.

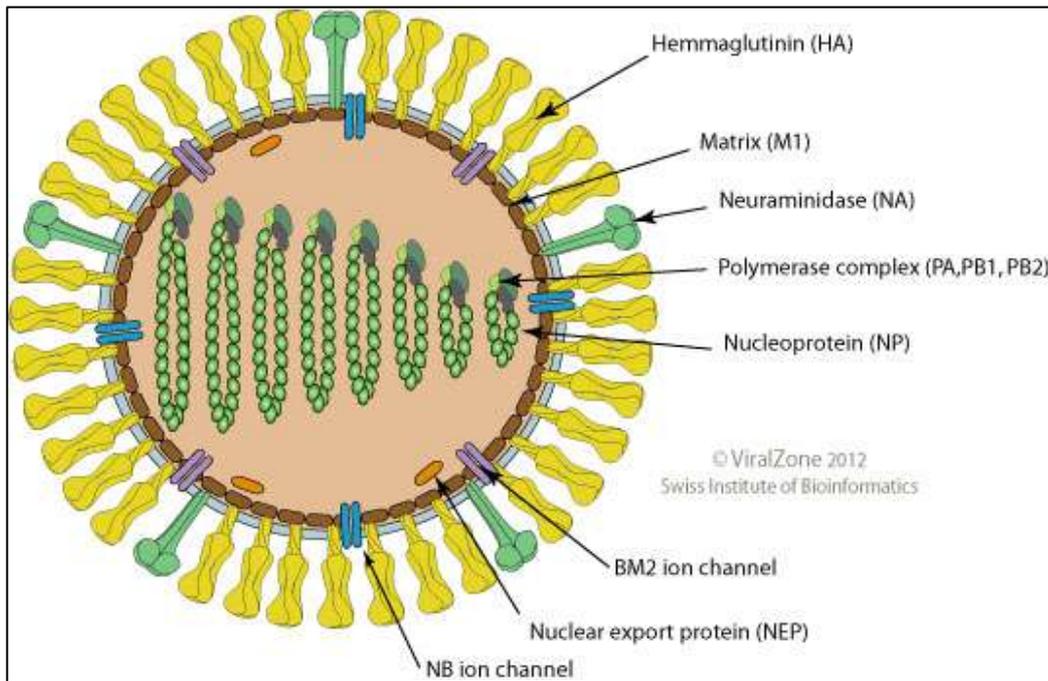


Figure 21. Organisation générale du virus Influenza B (d'après <https://viralzone.expasy.org>)

Pour les virions de l'influenza C, on ne trouve qu'une seule glycoprotéine de surface principale, la **protéine de fusion de l'hémagglutinine-estérase (HEF)**, qui correspond fonctionnellement aux virus HA et NA des virus de l'influenza A et B, et une protéine d'enveloppe mineure, **CM2** [40].

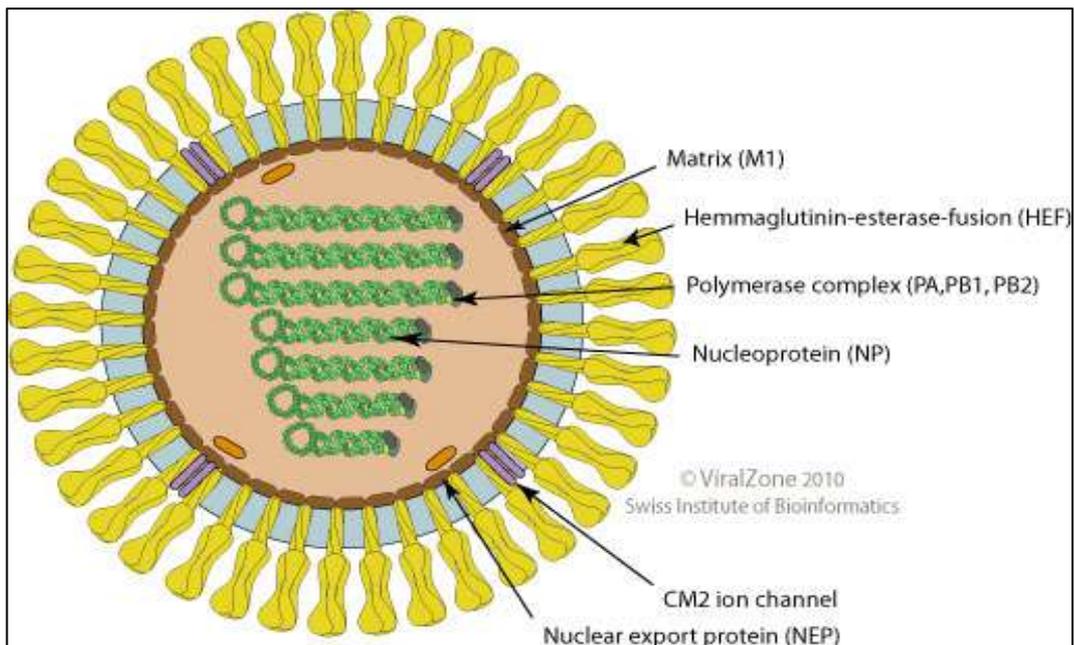


Figure 22. Organisation générale du virus Influenza C (d'après <https://viralzone.expasy.org>)

3.2.3. Génome

Les génomes des IAV et IBV comprennent chacun huit segments d'ARN viral simple brin (ARNv) de sens négatif (numérotés par ordre décroissant de longueur) tandis que l'ICV comprend un génome de sept segments.

Dans les IAV et IBV, les segments 1, 3, 4 et 5 ne codent que pour une protéine par segment : les protéines PB2, PA, HA et NP [44].

Tous les virus Influenza codent, au niveau de leur segment 2, pour la sous unité de la polymérase PB1 ; ce segment 2 code aussi pour la protéine accessoire PB1-F2, une petite protéine de 87 acides aminés ayant une activité pro-apoptotique, dans un cadre de lecture alternatif de +1 dans certaines souches d'IAV, ce qui lui est propre car aucun analogue à PB1-F2 n'a été identifié dans IAV et IBV. Inversement, le segment 6 d'IAV code seulement pour la protéine NA, alors qu'il code pour NA mais aussi pour NB (une protéine membranaire intégrale correspondant à la protéine M2 d'IAV dans un autre cadre de lecture pour l'IBV).

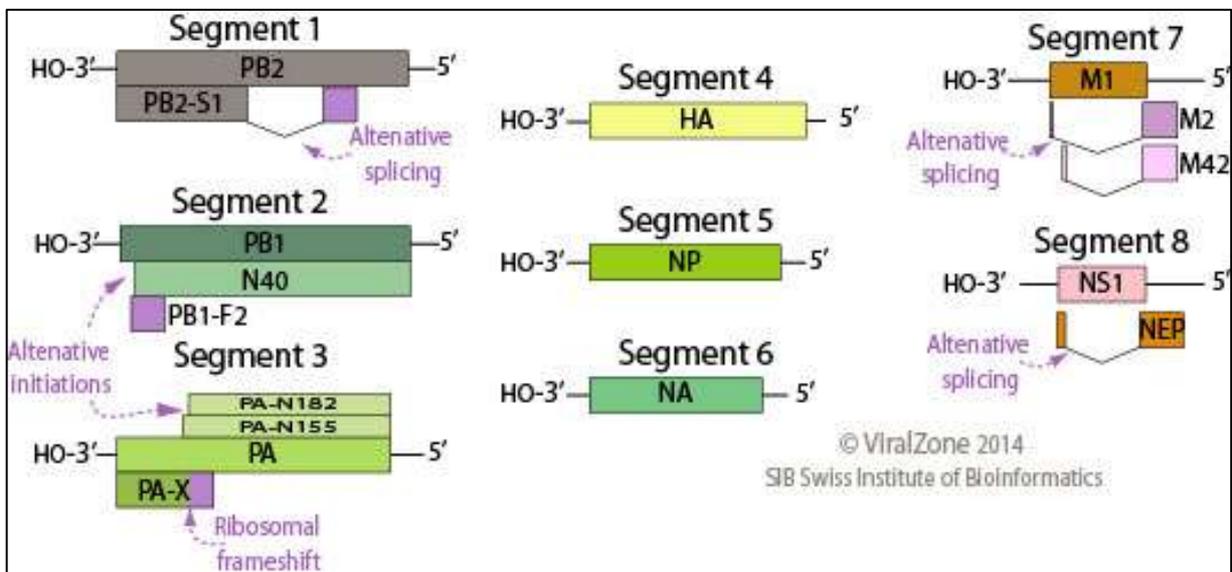


Figure 23. Organisation du génome des virus Influenza A (d'après <https://viralzone.expasy.org>)

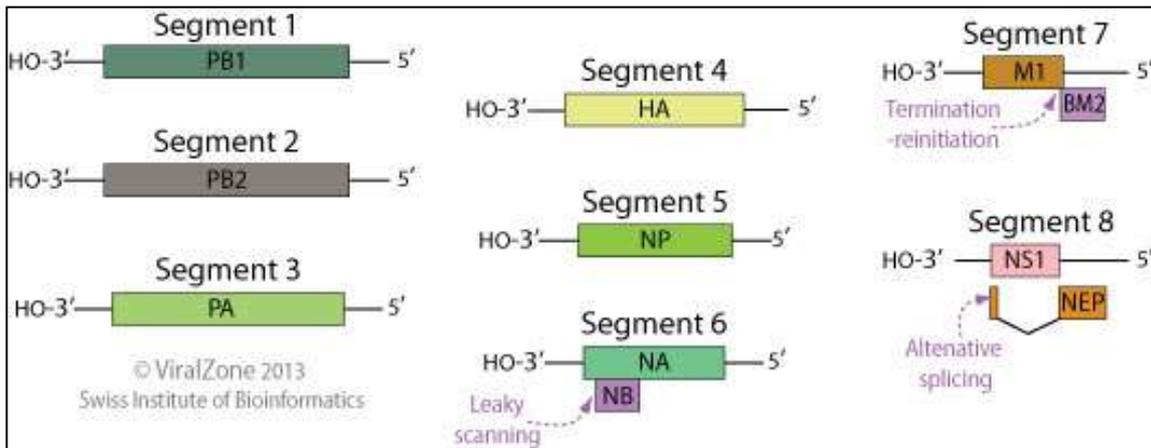


Figure 24. Organisation du génome des virus Influenza B (d'après <https://viralzone.expasy.org>)

Le segment 7 d'IAV et IBV code pour la protéine de matrice M1. Dans le génome d'IAV, le canal ionique M2 est également exprimé à partir du segment 7 par l'épissage de l'ARN [5], tandis qu'IBV code pour sa protéine membranaire BM2 dans un cadre de lecture alternatif de +2 [6,7]. Enfin, les deux virus possèdent un seul segment d'ARN, le segment 8, à partir duquel ils expriment la protéine NS1 antagoniste de l'interféron et, par épissage d'ARNm, le NEP / NS2.

L'organisation du génome d'ICV est quasiment similaire à celle d'IAV et IBV, comme vu précédemment, la protéine HEF remplace les protéines HA et NA au niveau de sa structure ; c'est pourquoi le génome d'ICV comporte un segment de moins que celui d'IAV et IBV [38].

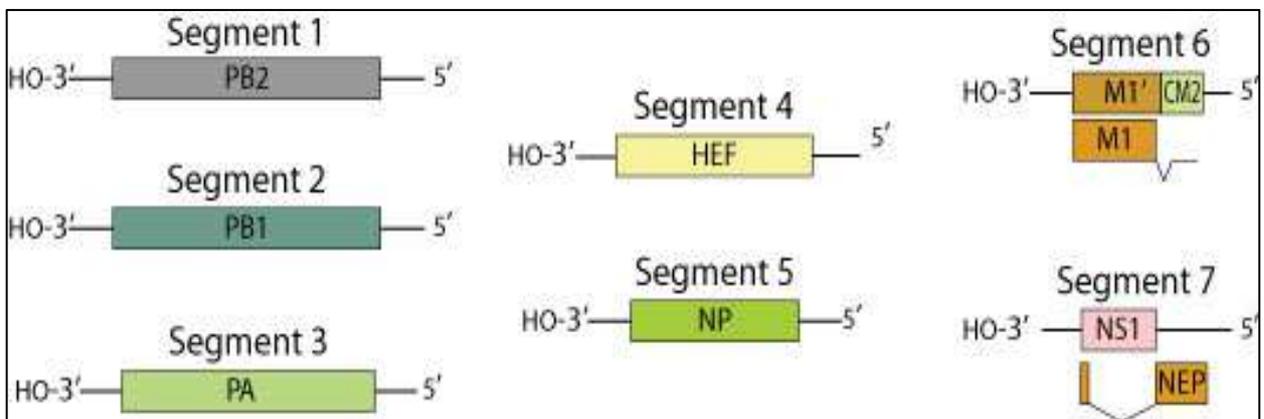


Figure 25. Organisation du génome des virus Influenza C (d'après <https://viralzone.expasy.org>)

3.3. Propriétés biologiques

3.3.1. Cycle viral

Le cycle viral est divisé en 4 étapes :

- L'attachement à la cellule hôte
- L'entrée du virus dans la cellule hôte et l'intégration de son génome
- La synthèse de l'ARN viral via réplication du génome viral
- La synthèse des protéines pour l'assemblage et le bourgeonnement des virions

3.3.1.1. Étape 1 : Attachement

Les virions s'attachent aux cellules par la liaison de leur hémagglutinine activée (ou de la protéine HEF pour ICV), aux récepteurs constitués d'acide sialique sur la membrane plasmique.

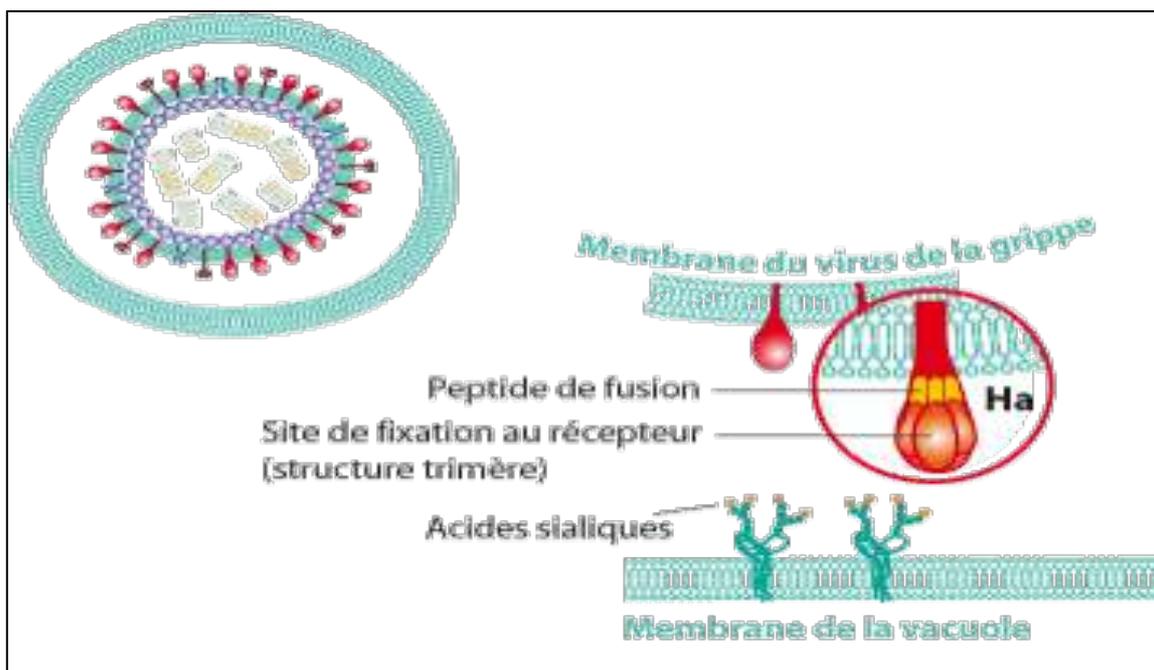


Figure 26. Liaison de l'hémagglutinine (ou HEF) avec les récepteurs d'acide sialique (*schéma personnel*)

Dans les diverses cellules hôtes existantes, les liaisons de l'acide sialique à un résidu galactose peuvent être nombreuses (carbone 2 pouvant se lier au carbone 3 ou au carbone 6 du galactose) ; l'hémagglutinine reconnaît ces différentes liaisons et c'est ce qui détermine le spectre d'hôte du virus.

Par exemple, les liaisons α -2,6 sont prédominantes dans les cellules épithéliales trachéales humaines, alors que les liaisons α -2,3 sont plus fréquemment rencontrées dans l'épithélium de l'intestin des canards. On trouve également des acides sialiques avec des liaisons terminales α -2,3 au niveau de l'épithélium respiratoire humain, même si leur abondance est moindre que ceux avec des liaisons α -2,6 [45][46]. Les humains, les autres primates et les porcs peuvent donc tout à fait être infectés par les virus de l'Influenza aviaire, mais leur efficacité sera inférieure à celle des souches humaines [47] [48].

3.3.1.2. Étape 2 : Entrée dans la cellule

Les virus Influenza entrent dans les cellules par endocytose récepteurs-médiée. Dans l'endosome, le tétramère M2 du canal ionique permet le passage d'ions H^+ dans la particule virale ; l'acidification de l'environnement interne du virion perturbe les interactions internes entre protéines, permettant la dissociation de la protéine matricielle M1 du complexe RNP. Le complexe RNP est ainsi libéré de l'enveloppe virale dans le cytoplasme cellulaire [49].

Cette acidité de l'endosome est très importante : elle va déclencher un changement de conformation de l'HA permettant d'exposer un peptide de fusion, le domaine hydrophobe du trimère HA2, qui sert de médiateur à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomique. Cela permet de créer un pore et contribue au relargage du complexe RNP dans le cytoplasme de la cellule hôte.

3.3.1.3. Étape 3 : Synthèse de l'ARN viral

Une caractéristique commune à tous les virus Influenza est que toute la synthèse de l'ARN prend **place dans le noyau des cellules**, ce qui nécessite que les RNP (du fait de leur taille) soient activement transportés jusqu'au noyau. Ainsi, une fois libérés, les RNP vont être acheminés vers le noyau de la cellule hôte au moyen de signaux de localisation nucléaire (NLS) des nucléoprotéines, qui ordonnent aux protéines de la machinerie de transport des cellules d'importer les RNP et d'autres protéines virales dans le noyau.

Le génome sert deux fois de modèle ; d'une part, pour la synthèse d'ARN messagers polyadénylés coiffés (matrice pour la traduction des protéines virales) et d'autre

part, pour la synthèse d'ARN intermédiaire réplcatif dans le sens positif (matrice pour l'ARN génomique de la descendance).

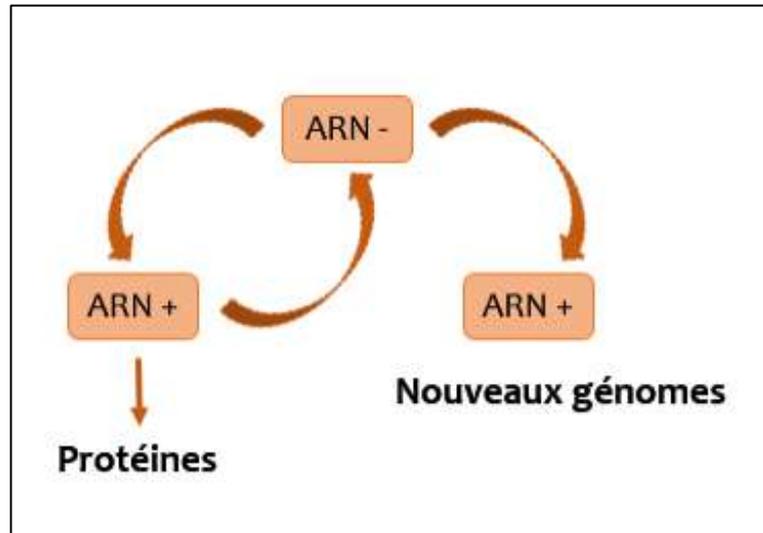


Figure 27. Devenir du génome viral au sein de la cellule hôte (*schéma personnel*)

L'ARNm va tout d'abord être coiffé, impliquant un phénomène de « cap snatching » : l'ARN polymérase virale va cliver la « cap » 5'-methylguanosine et 10 à 13 nucléotides des ARNm précurseurs cellulaires, qui seront ensuite capturés par les protéines PB1 et PB2 (composantes du RNP). Cela servira d'amorces pour initier la transcription d'ARNm viral par l'ARN polymérase virale.

Une fois polyadénylés et coiffés, les ARNm d'origine virale peuvent être exportés et traduits comme ARNm de l'hôte.

Tous les orthomyxovirus étendent la capacité codante de leurs génomes en produisant 2 protéines à partir de certains gènes, en utilisant un mécanisme d'épissage. L'IAV utilise l'épissage pour les segments 7 (M1 et M2) et 8 (NS1 et NEP/NS2) de ses gènes tandis que l'IBV utilise les segments 8 seulement et l'ICV les segments 6 (CM1 et CM2) et 7 [39].

3.3.1.4. Étape 4 : Synthèse des protéines pour l'assemblage et le bourgeonnement des virions

Les protéines constitutives de l'enveloppe HA, NA et M2 sont synthétisées par les ARNm sur des ribosomes liés à la membrane dans le réticulum endoplasmique, où elles sont pliées et acheminées vers l'appareil de Golgi pour modification post-traductionnelle. Les trois protéines ont des signaux qui les dirigent ensuite vers la membrane cellulaire pour l'assemblage des virions.

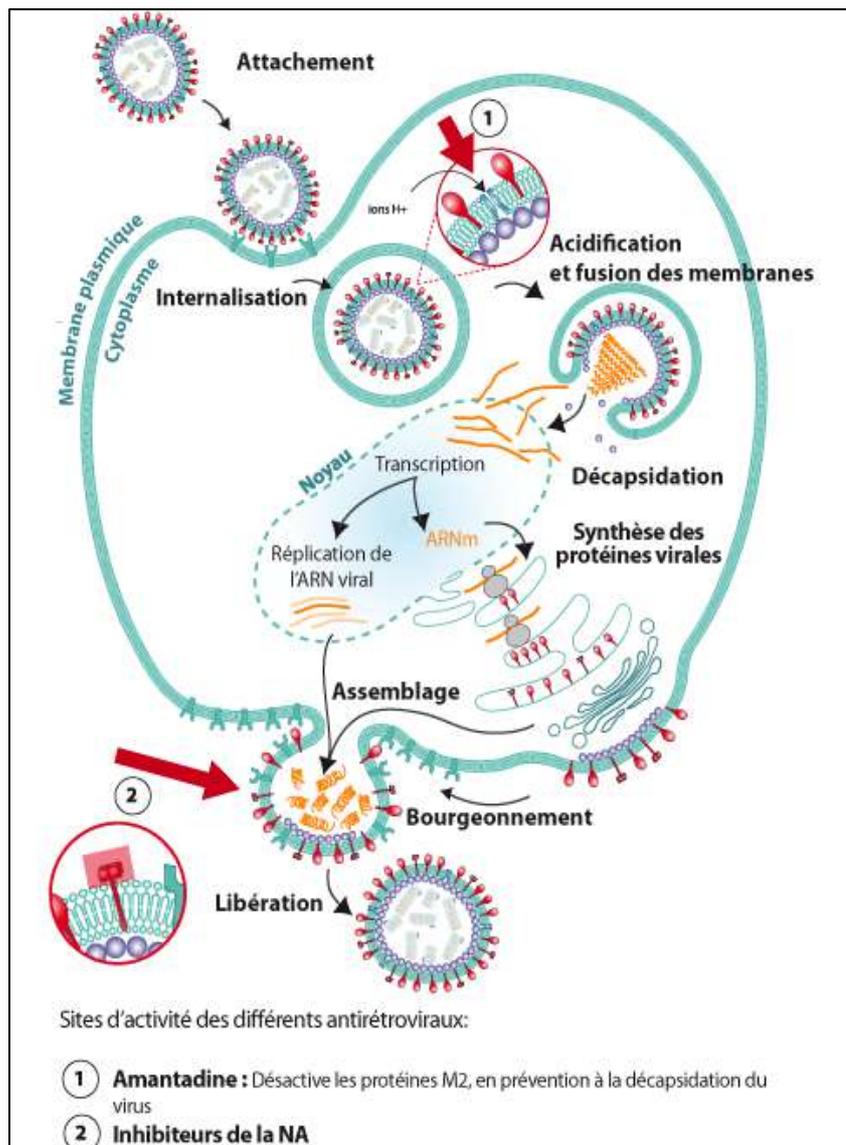


Figure 28. Schéma bilan du cycle viral et action des anti-viraux (d'après Université Catholique de Louvain – Belgique)

La traduction et le tri des protéines non constitutives de l'enveloppe sont moins bien connus. Le virus Influenza n'est infectieux que si ses virions contiennent un génome complet de huit segments (ou 7, pour l'ICV). Le bourgeonnement du virus Influenza est effectué au niveau de la membrane cellulaire et est médié par l'activité de clivage de la NA (comme vu précédemment). Ainsi, pour les virus possédant une NA inactive ou absente, ou lorsque l'on est en présence d'inhibiteurs de la NA, les particules virales s'agglutinent à la surface de la cellule et l'infectivité est par conséquent réduite.

3.3.2. Résistance

Du fait de leurs propriétés structurales et biochimiques, les virus influenza sont détruits par la chaleur (56°C pendant 30minutes), par l'acidité (pH=3), par les solvants des lipides (éther, détergents) et sont donc très labiles dans les conditions environnementales ordinaires.

Le virus se multiplie **dans les cellules de l'appareil respiratoire** et dans d'autres organes [38].

3.4. Évolution

L'évolution des virus Influenza est due à deux phénomènes distincts que sont les glissements et les cassures antigéniques.

Tout d'abord, les erreurs de réplication de l'ARN polymérase génèrent des mutations ponctuelles et donc des modifications mineures dans la séquence en acides aminés, touchant les virus de type A et de type B et étant à l'origine des différentes épidémies saisonnières ; ce phénomène est appelé **glissement antigénique**.

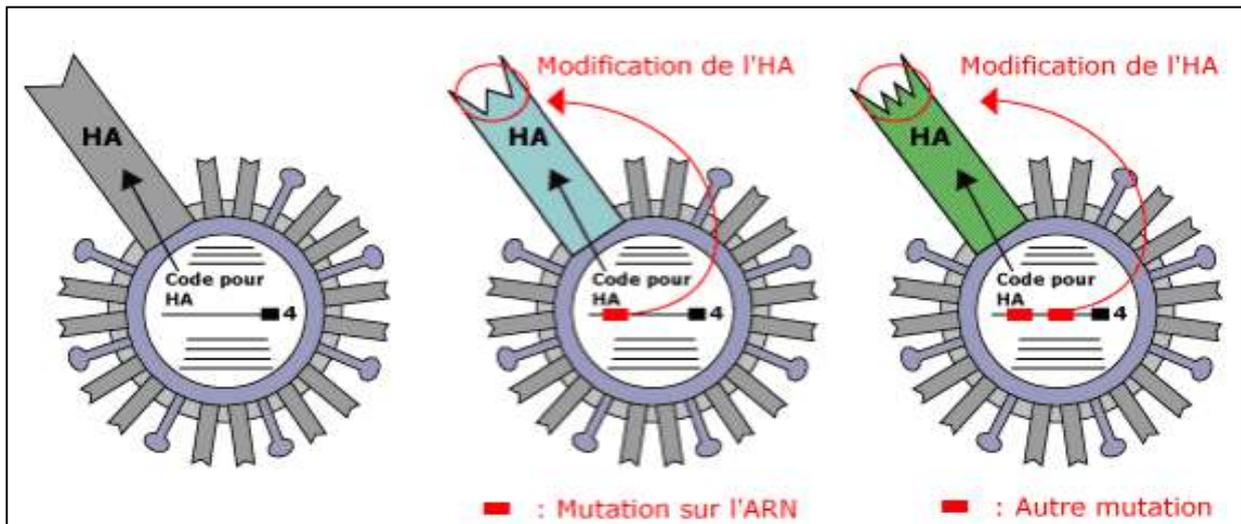


Figure 29. Glissements antigéniques au cours du temps (d'après <http://acces.ens-lyon.fr>)

Beaucoup plus rarement, et spécifiquement pour le type A, lorsque deux virus entrent dans une même cellule, des remaniements importants peuvent se produire par recombinaison génétique entre les segments génomiques. Autrement dit, des virus d'origine porcine, humaine ou aviaire peuvent échanger des fragments entiers d'ARN au sein d'un hôte intermédiaire (généralement le porc). Ces réassortiments, appelés **cassures antigéniques**, provoquent l'apparition de nouveaux variants. C'est le cas par exemple du virus A (H1N1) responsable de pandémies grippales (comme celle vécue en 2009 [50]) ; c'est un virus H1N1 issu de plusieurs événements dans le temps de co-infections et aboutissant in fine à la recombinaison de deux virus d'origine porcine, d'un virus aviaire et d'un virus humain [51].

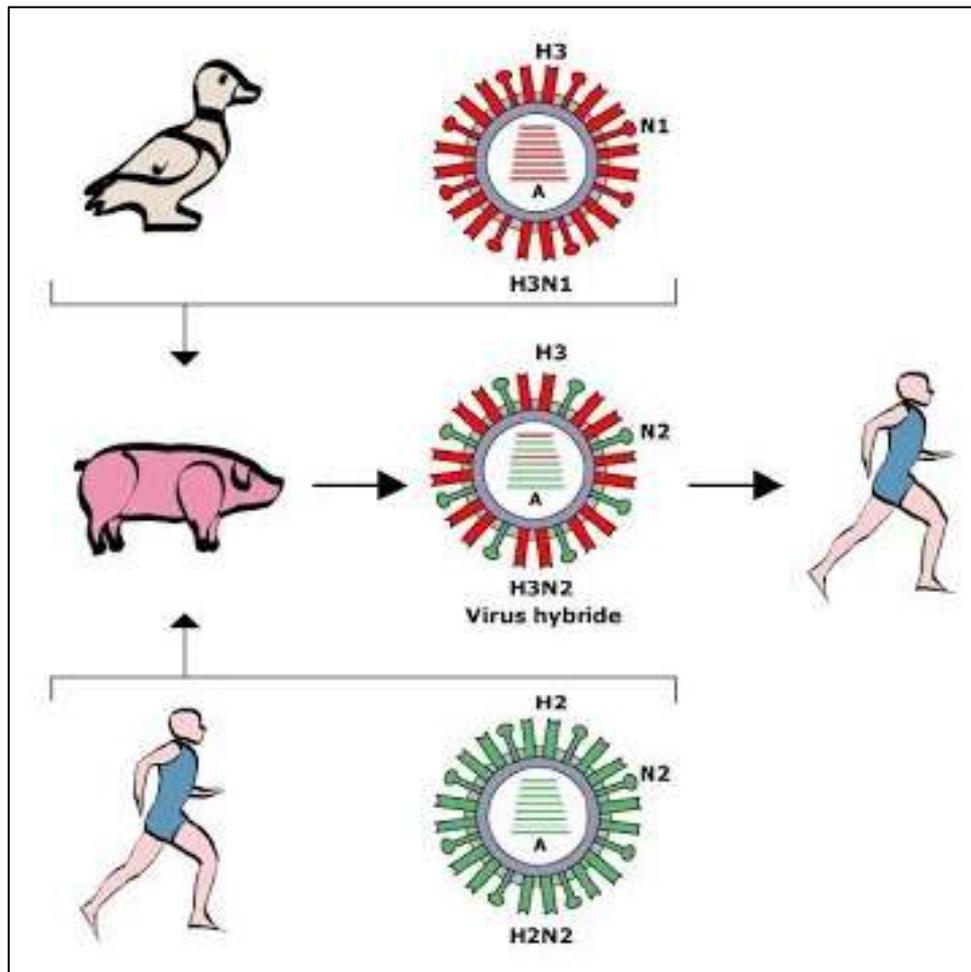


Figure 30. Principe des cassures antigéniques (d'après internet)

3.5. Phylogénie

Une phylogénie ou arbre phylogénétique est une structure de classification hiérarchique qui représente des relations de parenté entre « objets ». Elle est composée de nœuds internes formant des branches vers des descendants qui peuvent être d'autres nœuds internes ou des nœuds externes, aussi appelés feuilles. Ces feuilles constituent les « objets » dont on cherche à caractériser les relations de parenté et chaque nœud interne correspond à un ancêtre commun des feuilles qui en descendent. Elle est construite par comparaison d'espèces représentées par un type de données ; aujourd'hui quasi-exclusivement des séquences moléculaires consensus.

Les analyses phylogénétiques et le fait que tous les virus de sous-types HA et NA connus se multiplient dans les espèces aviaires, nous mènent à l'hypothèse que

tous les IAV infectant des mammifères sont dérivés de virus Influenza aviaires. Aux échelles de l'acide aminé et du nucléotide, les taux d'évolution sont significativement plus bas pour les virus aviaires des oiseaux sauvages. En effet, chez les animaux sauvages aquatiques, les virus Influenza semblent être sur une stase évolutive, suggérant une adaptation optimale de ces virus à leurs hôtes. Dans cette situation, les substitutions d'acides aminés pourraient ne pas fournir d'avantages sélectifs. Ainsi, même si des mutations surviennent avec des fréquences similaires, elles peuvent soit ne pas provoquer de changement d'acides aminés, soit en provoquer mais ayant pour produit un virus moins répliatif (et donc efficace) que le virus parental, qui va donc disparaître progressivement. En revanche, tous les segments de gène de virus de mammifères et de volaille plein-air continuent à accumuler des substitutions d'acides aminés.

Pour les IAV humains, les taux d'évolution varient parmi les segments, reflétant probablement les différences dans la pression de sélection de l'hôte.

Les gènes humains H3 et H4 évoluent beaucoup plus vite que les gènes PB2, PB1, PA, NP et M1. De plus, le ratio entre les changements silencieux/total diffèrent significativement parmi les différents gènes. Pour le gène H3 et H4, seulement 57% de tous les changements sont silencieux tandis que pour le gène PB3 plus de 90% le sont ; les variants ayant des mutations sur la protéine HA sont sans doute sélectionnés parce qu'ils confèrent un avantage en permettant au virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Inversement, pour la protéine PB2, seulement un niveau limité de pression immunitaire est imposé et les contraintes structurales sont sans doute plus importantes sur cette protéine que la protéine HA.

3.6. Diversité d'hôtes

L'IAV est retrouvé chez l'homme ainsi que chez de nombreux animaux, dont les oiseaux qui constituent le **réservoir principal**.

L'IBV est quant à lui principalement présent **chez l'homme** qui constitue son réservoir principal, mais on le retrouve également chez le **porc et les phoques**. Les IAV et IBV présentent des différences significatives d'évolution et d'épidémiologie ; la

existent sous la forme de multiples sous-types et causent une maladie chez de nombreux mammifères, les ICV en revanche, sont composés d'un seul sous-type dans son hôte primaire humain.

En plus des humains, une infection porcine par l'ICV a été rapportée en Chine.

En 1996, l'équipe de Kimura au Japon ont étudié les caractéristiques antigéniques et génétiques de **18 souches humaines de virus Influenza C** isolées dans les villes de Yamagata et Sendai au Japon entre janvier 1991 et février 1993. L'analyse antigénique avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine de l'HE a montré que les isolats pouvaient être divisés en trois groupes distincts et étroitement apparentés à C / Yamagata / 26/81, C / Aichi / 1/81 et C / Mississippi / 80, respectivement. La prise d'empreintes TI-oligonucléotidiques de l'ARN viral total a révélé que les six isolats appartenant au groupe du virus C / Yamagata / 26/81 avaient des génomes très similaires entre eux, mais très différents de ceux des isolats de 1988/1990 (sauf C / Yamagata / 10 / 89) du même groupe antigénique.

La comparaison des séquences nucléotidiques totales ou partielles des sept segments d'ARN des trois souches (C / Miyagi / 3/91, C / Miyagi / 9/91 et C / Miyagi / 2/92) représentatives des souches 1991/1993 du groupe du virus C / Yamagata / 26/81 avec ceux des isolats antérieurs du virus grippal C obtenus chez l'homme et le porc en 1980/1989 a montré que les souches 1991/1993, comme C / Yamagata / 10/89, sont plus étroitement apparentées aux virus isolés des porcs à Beijing (Chine) en 1981/1982, que de l'un des isolats humains. Cette observation suggère fortement que la transmission interspécifique du virus Influenza C entre l'homme et le porc a eu lieu dans la nature, bien que l'on ne sache pas si le virus a été transmis de porc à homme ou d'homme à porc [54].

3.6.1. Transmission

Utilisant le cobaye comme hôte modèle, l'équipe de Lowen et al, a étudié en 2007 les conditions de transmission de l'IAV et a montré que la propagation variait selon l'humidité relative et la température : en effet, ils ont réalisé vingt expériences à des humidités relatives comprises entre 20% et 80% et à 5°C, à 20°C ou à 30°C. Ces dernières ont montré que les conditions sèches et le froid favorisaient la transmission.

Pour les cobayes infectés hébergés à 5°C, la durée de l'excrétion maximale du virus était environ 40 heures plus longue que celle des animaux hébergés à 20°C. Cette augmentation de l'excrétion explique probablement que la transmission soit plus efficace à 5°C. Pour étudier le mécanisme permettant une croissance virale prolongée, ils ont déterminé les niveaux d'expression dans les voies respiratoires supérieures de plusieurs médiateurs immunitaires innés. Les réponses innées se sont révélées comparables entre les animaux hébergés à 5°C et à 20°C, ce qui suggère que la température froide (5°C) ne nuit pas à la réponse immunitaire innée de ce système. Bien que l'épidémiologie saisonnière de la grippe soit bien caractérisée, les raisons sous-jacentes de la propagation prédominante de l'hiver ne sont pas claires.

Cette étude a également permis de fournir des preuves expérimentales directes soutenant l'importance des conditions météorologiques dans la dynamique de la grippe et ainsi répondre à une question de longue date essentielle à la compréhension de l'épidémiologie et de l'évolution de la grippe [55].

4. Les virus influenza chez les bovins

Deux types de virus Influenza sont ici concernés ; les virus Influenza A et D.

4.1. Le virus influenza A chez les bovins

4.1.1. Cas naturels, isolement des souches, chronologie

L'IAV n'a été que très rarement décrit chez les bovins et par conséquent, les bovins n'ont pas été réellement considérés comme des hôtes sensibles au virus Influenza avant l'apparition de l'IDV (*que nous détaillerons dans la partie suivante*).

Par ailleurs, les études portant sur l'IAV chez les bovins sont très peu nombreuses, et la majorité des études proviennent de Russie, Allemagne et Pologne et sont souvent dans leur langue maternelle et donc, inaccessibles.

Le premier rapport concernant l'Influenza chez les bovins a été réalisé au Japon en **1949**, où 160 000 bovins ont été infectés, mais aucun IAV bovin n'a pu être isolé dans ces foyers [56]. Cet épisode de grippe bovine a duré peu de temps et s'est résolu en 2 à 3 jours. Les symptômes étaient notamment une température élevée (40 à 42°C), une blépharite, des écoulements nasaux, une anorexie, une pneumonie, des problèmes articulaires et une diminution de la production laitière.

Parallèlement aux pandémies historiques humaines, les bovins ont également présenté une maladie respiratoire de type grippal et plusieurs souches d'IAV ont été isolées dans différentes parties de l'Europe et de la Russie à cette époque. Certaines de ces souches avaient des glycoprotéines HA et NA similaires aux sous-types de H2 et H3 humains, tandis que d'autres étaient différentes de l'IAV humain [57].

Le premier isolat d'IAV d'origine bovine a été rapporté en 1962 [58]. Puis, de 1970 à 1980, des isolats d'IAV bovins ont été signalés dans différentes parties du monde tandis que vers 1968, une pandémie de grippe H3N2 à Hong Kong est survenue chez l'homme. En 1973, l'isolement et l'identification du virus A/Hong Kong/1/1968(H3N2) chez des bovins souffrant de maladies respiratoires étaient réalisés en Russie. De même, une souche d'IAV A/veau/Duschambe/55/71(H3N2) originaire de Russie a été étudiée dans les conditions expérimentales ; issue d'un cas naturel de maladie respiratoire chez un veau en phase terminale, elle a ensuite été isolée

dans des œufs de poule embryonnés [59]. D'autres souches H1N1 et H3N2 ont été isolées chez des bovins par la suite.

Une autre étude sur l'isolement des souches IAV à partir de prélèvements nasaux et d'échantillons de poumons de bovins gravement malades a été rapportée à Budapest, Hongrie, en 1974. Les animaux touchés étaient des veaux et des bovins de boucherie souffrant de toux associée à des symptômes respiratoires tels qu'un écoulement nasal, un larmolement, une anorexie et une léthargie. Aucune implication bactérienne n'a été rapportée dans l'étude, et l'isolation du virus sur des embryons de poulet a entraîné la mort des embryons au quatrième jour [60].

Les deux virus isolés en Russie et Hongrie (évoqués précédemment) étaient porteurs de NA de type 2 mais les glycoprotéines HA n'étaient pas identifiées. Les souches H3N2 étaient similaires à la souche de prototype humaine H3N2 A/Hong Kong/1/1968 [61].

D'autres études russes décrivant l'IAV bovin sont parues dans les années 1977-1978 mais aucun autre rapport concernant des maladies liées à des virus Influenza chez les bovins n'était disponible jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle. En Grande-Bretagne, plusieurs études sérologiques ont montré l'implication de l'IAV dans certaines maladies ; par exemple, des bovins présentant une séroconversion pour l'IAV, présentaient non seulement une baisse significative de production laitière mais aussi une maladie respiratoire. L'isolement du virus chez ces animaux n'a pas abouti, néanmoins, aucun anticorps contre les virus BVD, BHV-1, l'IBR, le PI3 et le VRSB n'a pu être détecté de manière concomitante ; ce qui suggère le rôle étiologique d'IAV dans la réduction de la production laitière [61].

D'autres cas de grippe chez des vaches laitières présentant une diminution de leur production laitière ont été rapportés. Plusieurs troupeaux ont été testés et sur de nombreux bovins, des titres en anticorps significativement élevés contre deux IAV humains ont été détectés : 60% pour A/England/333/80(H1N1) et 65% pour A/England/427/88(H3N2), alors que seulement 5% des vaches étaient séronégatives pour les deux virus. Ces observations ont clairement indiqué l'exposition et la sensibilité naturelle du bétail aux IAV humains. D'autres études (en Irlande du Nord par exemple), ont montré que l'association IAV humain et chute de production laitière chez les vaches était répandue dans le début des années 2000.

En 2008, d'autres nouvelles études ont à nouveau trouvé des titres d'anticorps importants, dirigés contre les mêmes IAV humains, chez un troupeau de vaches laitières souffrant d'une chute aiguë de la production laitière et testées séronégatives contre le VRSB, le BVD, l'IBR et le PI3 [76].

En bilan, **l'IAV a circulé chez les bovins** à deux moments différents : dans les années 1970-1981 puis dans les années 1997-2006. Les souches isolées étaient des souches humaines, et ce dans différentes parties du monde, montrant que la transmission du virus a eu lieu à l'interface homme-bétail. Le rôle épidémiologique des bovins dans la grippe humaine n'a en revanche pas été déterminé.

4.1.2. Cas expérimentaux, expression clinique

Plusieurs études expérimentales ont été rapportées sur des bovins au 20^{ème} siècle.

En 1977, une étude a comparé l'infection expérimentale de veaux par trois souches H3N2 de type Hong Kong (A/Michigan/1/72, A/England/42/1972 et A/Aichi/2/1968) et une souche H3N2, A/veau/Duschambe/55/1971. L'inoculation des 3 premières souches n'a déclenché aucune maladie respiratoire chez les veaux alors que l'inoculation de l'autre souche a provoqué une maladie avec écoulement nasal, toux et rhinite légère. Néanmoins, les virus A/Aichi/2/1968 et A/veau/Duschambe /55/1971 ont été détectés pendant près d'une semaine, indiquant que les veaux étaient sensibles à l'IAV humain [62].

En 2007, l'inoculation expérimentale de veaux avec la souche HPAIV A/cat/Germany/R606/2006 (H5N1) a révélé une séroconversion à 100% avec des anticorps neutralisants dirigés contre la souche homologue. La neutralisation du virus et les tests ELISA effectués 3 mois après l'inoculation ont montré une séroconversion chez tous les veaux inoculés mais aussi ceux en contact, fournissant ainsi des preuves de la transmission par contact [63].

Au contraire, une autre infection expérimentale de six veaux de boucherie et de deux poneys avec A/equine/Kentucky/1991 (H3N8) n'a pas provoqué d'excrétion virale, de symptômes cliniques ni de maladie chez les veaux par rapport aux poneys [64].

Ces études expérimentales montrent que **les bovins pourraient être infectés par un IAV dérivé de sous-types d'IAV aviaire, porcine et humaine.**

Compte tenu du faible nombre d'expériences réalisées, des études supplémentaires, notamment en Europe, apparaissent nécessaires pour déterminer le rôle pathogène des IAV chez les bovins et pour définir l'importance réelle des infections dans les conditions naturelles. L'adaptation du tropisme des virus influenza, en particulier humains, aux bovins est probablement limitée, en raison du faible nombre de cas déclarés chez les bovins, pourtant en contact étroit avec les humains.

4.2. Le virus influenza D : données actuelles

Jusqu'en 2011, seuls les types A, B et C des Influenza étaient identifiés. Le virus Influenza D (IDV) fut isolé pour la première fois en avril 2011 en Oklahoma aux États-Unis, chez des porcs présentant des signes respiratoires semblables à une grippe [65].

Avant cela, il était établi que dans la famille des Orthomyxovirus, seuls les IAV présentaient plusieurs sous-types. Ce virus découvert a été étudié davantage et identifié comme présentant 50% d'identité globale d'acides aminés vis-à-vis des ICV humains ; il était donc ressemblant au niveau de son organisation génétique, mais à la fois distinct en partie des autres ICV : une transmission inter-espèce à l'origine de ce nouveau sous-type a donc été suspectée et le virus souche fut alors initialement désigné comme le virus C/swine/Oklahoma/1334/2011(C/OK) [66].

Une fois le séquençage complet du génome de ce virus réalisé, l'analyse phylogénétique des protéines virales a révélé que l'expression de la protéine de matrice M1 était différente de celle des ICV : il a été montré que la **divergence** entre C/OK et l'ICV humain étaient similaires à **ceux observés entre IAV et IBV**. Aux vues de ces constatations, la souche a été étudiée afin de voir si d'autres animaux pouvaient en être porteurs. Ainsi, le virus nommé C/OK a été identifié dans des troupeaux de bovins aux États-Unis.

Afin de clarifier le statut taxonomique de C/OK, du réassortiment in vitro et du typage sérologique par immunodiffusion en gel d'agar (AGID) ont été effectués. Les réassortiments in vitro utilisant deux ICV humains et deux virus C/OK porcins et bovins ont démontré que les ICV humains et C/OK étaient incapables de se réassortir et de

produire un nouveau virus. D'un point de vue antigénique, aucune reconnaissance sérologique croisée des virions dédoublés dans les détergents n'a été observée dans le cadre de la méthode AGID.

L'ensemble de ces résultats ont donc démontré que le virus C / OK était génétiquement et antigéniquement distinct de l'ICV humain. La classification du nouveau virus dans un genre distinct des Orthomyxoviridae de la famille fut proposée. [1]

La découverte de ce virus à la fois chez des porcs et à la fois chez des bovins est importante ; la co-circulation de plusieurs sous-types de virus Influenza permet une évolution virale rapide **par réassortiment antigénique**, une propriété qu'on pensait uniquement possédée par les IAV. La capacité de ce nouveau virus à se propager et infecter d'autres mammifères, suggère que de tels virus peuvent devenir une menace potentielle pour la santé humaine.

4.2.1. Propriétés et organisation du virus

L'IDV est un virus dont la structure génomique est identique à celle de l'ICV ; il se compose de 7 segments génomiques contenant de l'ARN simple brin de sens négatif (contrastant avec les 8 segments des types A et B).

Ces segments coderaient apparemment pour 9 protéines : une glycoprotéine hémagglutinine-estérase de fusion (HEF); les polymérases PB2, PB1 et P3; une nucléoprotéine; des protéines de matrice (M1 et CM2) et des protéines non structurales (NS1 et NEP).

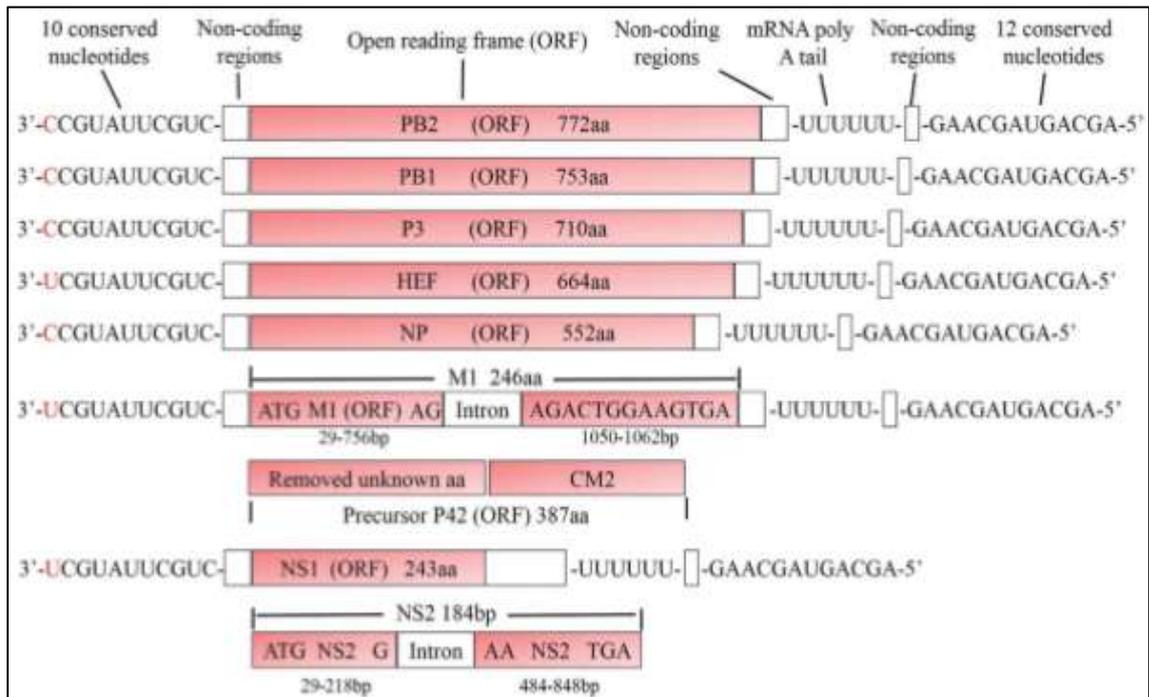


Figure 32. Structure des 7 segments génomiques de l'IDV [52]

Sur la figure ci-dessus représentant la structure génétique détaillée de l'IDV, les cadres de lecture ouverts pour chaque segment sont marqués en rouge, le nom et la taille des protéines codées sont également indiqués.

Les protéines PB2, PB1, P3, HEF, NP sont traduites à partir d'un ARN transcrit, alors que les protéines M1 / CM2 et NS1 / NS2 sont générées par épissage. Chaque segment contient 10 nucléotides conservés à son extrémité 3' et 12 nucléotides conservés à son extrémité 5'. Un segment poly-U proche de l'extrémité 5' est utilisé pour équiper chaque ARNm d'une queue Poly-A.

Chaque segment contient une région non codante (NC) à ses extrémités 5' et 3'. Les 11 premiers nucléotides (30-C / UCGUAUUCGUC-50) à l'extrémité 3' et les 12 derniers nucléotides (50-AGCAGUAGCAAG-30) à l'extrémité 5' sont identiques entre les 7 segments, sauf la position 1 à l'extrémité 3' qui est soit une cytosine soit une uridine [65]. Les séquences 3' et 5' du virus Influenza D sont également identiques à celles de l'ICV, à l'exception du nucléotide en position 5 à l'extrémité 3', qui est une adénine dans l'IDV, mais une cytosine dans l'ICV.

Ces régions conservées forment des structures « **panhandle** » par complémentarité partielle inversée entre les régions 5' et 3'. Cette structure unique sert de promoteur à la transcription des ARNm et joue un rôle essentiel dans la réplication et l'encapsidation du génome [67].

En outre, une région riche en uridine à l'extrémité 5' de chaque segment, sert de modèle pour la queue poly A présente à l'extrémité 3' de chaque ARNm. Les régions non codantes 5' et 3', ainsi que les séquences codantes terminales de chaque segment, contiennent également les informations requises pour le conditionnement de RNP viraux dans des particules virales.

La grande similarité des séquences conservées aux extrémités des segments de gènes suggère la possibilité de réassortiments de segments viraux entre ICV et IDV dans la nature. Cependant, cela n'a pas été observé en conditions expérimentales. Les souches IDV ainsi que les souches ICV ne peuvent échanger des segments de gènes qu'entre elles [1].

Les 3 segments les plus longs produisent respectivement les protéines PB2, PB1 et PA/P3, respectivement, ce qui forme le **complexe de polymérase hétérotrimerique** qui effectue la réplication et la synthèse d'ARNm viral. PB1 contient le site actif de la polymérase (de même pour la PB1 de l'IDV), alors que PB2 et PA / P3 comprennent respectivement la liaison cap et les domaines de l'endonucléase requis pour l'initiation de la transcription par cap-snatching (comme vu précédemment). Le site actif d'endonucléase de PA / P3 est identique entre l'IDV et les autres virus Influenza. De même, les résidus de liaison à la guanine du domaine de liaison à la coiffe sont conservés entre IDV et IAV, mais les **résidus de liaison au phosphate sont différents**.

La protéine codée par le troisième segment s'appelle P3 (au lieu de PA comme dans le cas de IAV et IBV) car P3 de ICV ne présente pas de **point isoélectrique négatif**. Cependant, le point isoélectrique prédit de P3 de IDV est de 6,2, ainsi situé entre celui du virus grippal A / B (7.2) et celui du virus grippal C (5.2) [65].

Le quatrième segment code la **glycoprotéine HEF**, l'unique spicule de l'enveloppe virale, qui est décrite en détail ci-dessous.

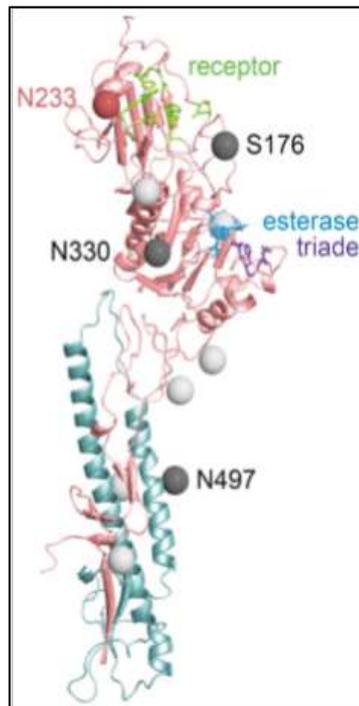


Figure 33. Structure de l'ectodomaine d'un monomère de l'IDV [52]

Sur la figure, les chaînes polypeptidiques des sous-unités HEF1 et HEF2 sont colorées en rouge et bleu, respectivement. Les acides aminés du site de fixation du récepteur sont coloriés en vert. Les résidus asparagines des sites de N-glycosylation qui sont conservés entre les l'HEF de l'IDV et de l'ICV sont notifiés en petits ronds gris clair. Ceux qui ne sont pas conservés sont marqués en gris foncé. S176 est un site de glycosylation présent sur l'HEF de l'ICV et pas IDV. N330 et N497 sont deux sites de glycosylation présents sur l'HEF de IDV et pas de l'IDC [52].

Le cinquième segment produit la **nucléoprotéine NP** qui, avec les polymé-
rases et les ARNv, constitue le complexe de la ribonucléoprotéine virale (RNPv).

Le sixième segment code pour deux protéines, la **protéine matricielle M1** qui est une protéine membranaire périphérique recouvrant la membrane virale à l'intérieur et **CM2**, une petite protéine transmembranaire qui présente une activité de canal H⁺/

La plus grande protéine M1 est traduite à partir d'un ARN épissé, mais le déroulé de l'épissage diffère entre ICV et IDV.

Le segment M de ICV produit la protéine M1 par introduction d'un codon STOP dans l'ARNm, tandis que l'épissage du segment M de l'IDV ajoute un peptide supplémentaire de 4 acides aminés dans l'exon précédent. L'ARNm non épissé est traduit dans la protéine précurseur p42, qui contient un peptide signal interne qui est ensuite clivé pour générer la protéine membranaire intégrale CM2.

Le septième segment produit également deux protéines non structurales **NS1** et **NS2** par épissage. L'ARNm non épissé est traduit en protéine NS1 qui inhibe la réponse à l'interféron cellulaire de type I et l'ARNm épissé traduit une protéine NS2 plus courte (aussi appelée NEP, comme vu précédemment).

4.3. Spectre d'hôtes et réservoir

Plusieurs études ont approuvé l'hypothèse selon laquelle les bovins seraient les réservoirs du virus et il semblerait également que les veaux jeunes, sevrés, mélangés et immunologiquement naïfs soient les plus susceptibles aux infections du fait d'une baisse d'anticorps maternels après 6 mois.

Tout d'abord, aux États-Unis, des cas d'IDV ont été signalés chez des bovins au Texas, en Californie et dans des États du Midwest, tels que le Kansas, le Minnesota, le Nebraska et l'Oklahoma, suggérant en premier lieu, d'après des études sérologiques, que les bovins sont le réservoir hôte naturel de ce nouveau virus (Hause et al., 2014). Puis, une autre étude a permis d'isoler le virus sur des animaux malades ; mais le lien de cause à effet n'était pas clair, il n'était pas évident qu'IDV pouvait ou non causer une maladie clinique chez les bovins. Les résultats de cette étude ont mis en évidence la présence du virus dans la population de bovins du Mississippi depuis au moins 2004 et le fait que les veaux sevrés et mélangés jouent probablement un rôle important dans l'entretien et la transmission du virus.

Afin d'étudier cet aspect, l'équipe de Ferguson et al ont ensuite étudié 3 veaux laitiers chez lesquels on avait inoculé une souche d'IDV en intra nasale (D/bovine/Mississippi/C00046N/2014). Puis au jour 1 post-inoculation : un veau séronégatif a été ajouté à chaque enclos d'animaux expérimentaux. Le troupeau en traitement et le troupeau en contact ont présenté une séroconversion et du virus a été détecté dans les voies respiratoires dans les deux groupes. A l'histologie, on pouvait noter une augmentation significative du nombre de neutrophiles dans l'épithélium trachéal des veaux

infectés comparé au groupe « contrôle » en contact. Tous les veaux ont présenté des signes cliniques respiratoires, mais ceux-ci étaient d'intensité minime et il n'y avait pas de modifications de fréquence cardiaque, fréquence respiratoire ni de température associée, par rapport au groupe « contrôle » en contact : cela a permis d'établir que c'était le virus qui était responsable de l'inflammation trachéale.

Pour mimer la transmission zoonotique, deux furets ont été exposés à un jouet en plastique imbibé d'un écoulement nasal provenant d'un veau infecté : aucun des deux furets n'a présenté de signe clinique ou de séroconversion.

Ainsi, il a été montré dans cette étude qu'IDV provoque une maladie respiratoire minime de l'appareil respiratoire superficiel lors d'infection expérimentale de troupeau et qu'il peut être activement transmis au sein des troupeaux par des contacts étroits intra-enclos. Par contre, ils n'ont pas observé de transmission au furet. Cela a renforcé l'hypothèse selon laquelle **les bovins seraient les réservoirs du virus** [68].

Depuis, il a été montré qu'IDV pouvait infecter les **ovins, porcins, et très probablement les dromadaires**. De même, des chameaux au Kenya ont été testés positifs pour les anticorps anti-IDV, ce qui suggère que ce virus a également une gamme d'hôtes plus large que prévu. Des études sont nécessaires pour clarifier la réactivité croisée des 2 virus (ICV et IDV) chez les camélidés dans les tests sérologiques, afin de déterminer quelles lignées d'IDV circulent en Afrique et évaluer si ICV et IDV peuvent infecter tous les deux ces animaux.

Dans les échantillons de sérum de porc, les taux de séropositivité dans les essais d'inhibition de l'hémagglutination sont faibles (9,5%), ce qui indique que le virus circule chez les porcs, mais n'est pas généralisé. La prévalence de l'IDV chez les bovins est plus élevée, en particulier chez les veaux.

La transmission intercontinentale et la forte prévalence d'IDV, en particulier chez les bovins, mettent en évidence sa **menace potentielle pour les autres animaux d'élevage et les humains**.

4.3.1. Épidémiologie

4.3.1.1. Prévalence

A ce jour, l'IDV a été signalée aux États-Unis, en Europe : en France, au Luxembourg, en Italie et en Irlande ; en Asie : au Japon, en Chine [1] [3] [70].

Des enquêtes sérologiques récentes en Italie ont montré des taux de séroprévalence extrêmement élevés chez les bovins (**92,4%** de séropositifs) et une séroprévalence faible mais croissante chez les porcs, passant de 0,6% en 2009 à 11,7% en 2015 [75].

Au Luxembourg, des anticorps anti-influenza D ont été détectés chez **80,2%** des bovins échantillonnés en 2016 (n=440, sur 44 fermes), ce qui suggère une circulation étendue du virus dans tout le pays, pouvant être qualifiée d'hyperenzootie dans le pays. Chez les porcins, la séroprévalence était faible mais a augmenté de 0% à 5,9% de 2012 à 2014-2015 [69].

En France, les dernières données datent de juin 2019 [73]. Cette étude s'est basée sur la collecte (initialement pour une surveillance d'IBR) de 533 sérums d'animaux répartis sur l'ensemble de la France. Les résultats en sérologie ont montré que le virus circulait au sein du pays entier, et ce, dans toutes les espèces testées. La séroprévalence a été mesurée comme plus élevée chez les bovins (47,2% en moyenne) que chez les petits ruminants (1,5% chez les ovins et 3,2% chez les caprins). De plus, les petits ruminants présentaient des titres en anticorps beaucoup plus faibles (1:20 à 1:160) que ceux observés chez les bovins (de 1:20 à 1:1280). Par ailleurs, pour chaque lot de prélèvement sur une année, au moins un sérum était séropositif. Des disparités de prévalence sérologique entre les régions françaises ont été observées, allant de 3% jusque 70% pour les bovins, de 0 à 5,5% pour les ovins et de 1,3 et 5,8% pour les caprins. Pour les bovins, la plus forte séroprévalence a été observée en Pays de la Loire et la plus faible en Hauts-de-France. La plus haute prévalence pour les pays et les régions du Haut-de-France.

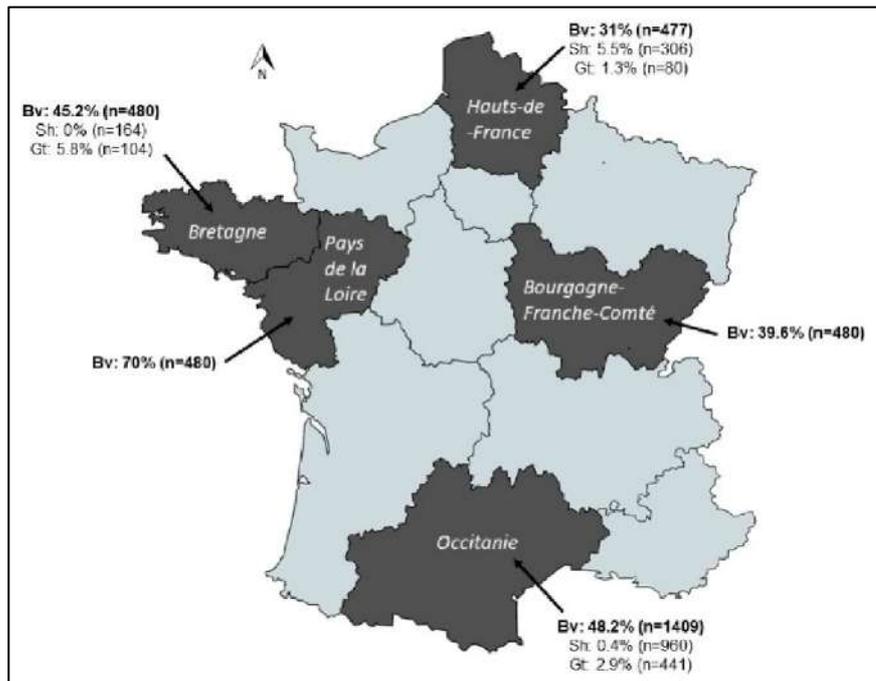


Figure 34. Séroprévalence d'IDV dans les troupeaux bovin, ovin et caprin en France entre 2014 et 2018 [73]

Des anticorps IDV ont aussi été détectés chez des bovins et des petits ruminants d'Afrique du Nord (Maroc) et de l'Ouest (Togo et Bénin). De même, au Kenya, les dromadaires portaient des anticorps anti-virus de la grippe C ou D, indiquant un nouvel hôte potentiel pour ces virus. Il a donc été montré qu'IDV circule en Afrique du Nord et de l'Ouest depuis au moins 2012 ; chez des bovins au Maroc (de 2012 à 2015), des bovins au Bénin et au Togo (à partir de 2014) et des petits ruminants au Togo (à partir de 2013).

En Irlande, une étude a été réalisée à partir d'écouvillons nasaux (archivés des années 2014-2019) sur des bovins (320) chez lesquels une maladie respiratoire avait été cliniquement diagnostiquée. Au total, 18/320 (5%) des échantillons étaient positifs pour le virus Influenza D par PCR. Parmi les 18 échantillons positifs, 13 étaient également positifs par PCR pour 1 ou 2 autres agents pathogènes viraux (BHV-1, Pi3, CoVB, VRSB, BVD). Le séquençage de ces échantillons a montré que les virus d'Irlande étaient regroupés avec les séquences de virus obtenues en Europe dans le groupe D/swine/OK/1334/2011.

En Chine, deux études ont été réalisées. La première a permis d'identifier 3 IDV bovins hautement homogènes à ceux identifiés aux États-Unis, ce qui suggère que l'IDV bovin circule probablement beaucoup et évolue lentement dans le monde.

451 écouvillons nasaux ont été prélevés sur des sujets apparemment sains de 15 troupeaux de bovins dans 2 villes dans le Shandong en avril et mai 2014. Trois (0,66%) d'entre eux étaient positifs pour le virus. Puis, les génomes entiers des virus correspondants ont été séquencés ; les virus ont été désignés sous le nom de virus D/bovine/Shandong/Y127/2014, D/bovine/Shandong/Y125/2014, D/bovine/Shandong/Y217/2014, respectivement. Les séquences d'acides aminés des 7 segments génomiques de ces trois virus partagent une homologie de 95,35 à 99,22% avec leurs homologues isolés aux États-Unis. Leurs séquences et structure génomiques ainsi que leurs relations phylogénétiques renforcent l'idée que ces IDV sont très similaires à ceux identifiés aux États-Unis en 2013. Cela montre également qu'un nouveau type de virus Influenza bovin circule probablement largement au sein de l'espèce, mais évolue lentement dans le monde, avec peu de différences génomiques [70]. Dans une deuxième étude, l'IDV a été détecté également comme largement répandu chez des animaux d'élevage dans la province du Guangdong, dans le sud de la Chine. Les taux d'infection par le virus étaient particulièrement élevés chez les chèvres et les porcs.

De l'ARN viral a également été détecté dans des **échantillons de sérum et des fèces** d'animaux atteints de certaines maladies graves.

En 2016, 607 échantillons cliniques de 4 espèces d'animaux, atteints de différentes maladies, et 250 écouvillons nasaux d'animaux asymptomatique, ont été récoltés dans 16 fermes de 4 villes de la province du Guangdong. En plus, ont été pris au hasard 200 échantillons de sérum de vaches de race Prim'Holstein qui étaient archivés, soit 40 par an, de 2011 à 2015 pour étudier la possibilité d'une 1^{ère} distribution d'ARN d'IDV dans cette région. Par PCR et séquençage ultérieur, 31 écouvillons nasaux sont revenus positifs pour le virus soit 12,8% (20/156) chez les vaches laitières, 7,3% (4/55) chez les jeunes bovins et 36,8% (7/19) chez les porcs. Sur les 324 échantillons de sérum totaux, 7,8% (15/193) sont revenus positifs chez les bovins laitiers, 5,9% (3/51) chez les buffles et 33,8% (27/80) chez les caprins. Le taux d'infection était également élevé (28,9% soit 13/45) dans les échantillons de poumon de porc.

L'analyse de l'alignement des séquences a montré que les séquences nucléotidiques des IDV identifiés dans cette étude partageaient une similarité élevée (99% à 100%) avec les séquences précédemment décrites en Chine et une faible similarité

(93,8% à 98,8%) avec des séquences provenant des États-Unis, de la France, de l'Italie, du Mexique et du Japon. De même, une analyse phylogénétique a révélé que toutes les séquences d'IDV dans cette étude étaient regroupées avec des séquences précédemment identifiées en Chine, et appartenaient à la lignée D/OK.

Aux États-Unis, la séroprévalence et la transmissibilité du virus ont été étudiées chez les porcs sauvages en 2012-2013 dans 4 États américains. Sur 256 porcs testés, 57 (19,1%) étaient séropositifs pour l'IDV. Sur 96 échantillons archivés séropositifs pour l'IAV prélevés dans 16 États américains entre 2010 et 2013, 41 (42,7%) étaient séropositifs pour l'IDV.

Des études portant sur l'infectivité de l'IDV chez des porcs sauvages ont démontré que l'IDV était excrété 3 à 5 jours après inoculation. Les animaux ont séroconverti 21 jours après. Des antigènes viraux ont été détectés par coloration immunohistochimique dans les cellules épithéliales des voies respiratoires, de la trachée, du palais mou et des poumons. Ces résultats suggèrent ainsi que les porcs sauvages pourraient jouer un rôle important dans l'écologie de l'IDV [71].

Au Japon, la présence d'IDV a été étudiée en janvier 2016 en utilisant des méthodes d'inhibition de l'HA pour tester 28 échantillons de sérum provenant d'animaux bovins femelles sains. Deux virus présentant des antigénités hétérologues, D/swine/Oklahoma/1334/2011 (D/OK) et D/bovine/Nebraska/9-5/2012 (D/NE) (9), ont été utilisés en comparatifs. Huit échantillons étaient positifs pour les anticorps dirigés contre les deux virus, avec des titres d'HA de 1: 80-1: 640 pour D/OK et avec des titres de 2 à 4 fois inférieurs (1: 40-1: 160) pour D/NE dans chaque échantillon, indiquant des infections antérieures chez ces vaches, dont l'âge variait de 2 à 9 ans.

Les auteurs ont également détecté des anticorps anti-HA dans des échantillons de sérum d'autres troupeaux de bovins dans plusieurs régions du Japon. Ces données démontrent la circulation d'IDV au Japon.

Les arbres phylogénétiques générés en utilisant des séquences de nucléotides de segments individuels de la souche japonaise (identités de nucléotides de 95% à 97% avec d'autres souches) ont indiqué que cette souche était différente des souches isolées dans d'autres pays, bien que le segment de matrice ait été inclus dans le même groupe que les isolats de France et de Chine. La souche japonaise présentait une position particulière différente des autres au niveau de la sérine, identique à une

souche française, formant probablement le troisième groupe de l'antigénicité de l'hémagglutinine.

Une enquête sérologique a été menée pour étudier la séroprévalence de l'IDV chez les petits ruminants (ovins et caprins) et les volailles (poulet et dinde). Les résultats montrent des taux de séropositivité de 5,2% chez les ovins et de 8,8% chez les caprins, indiquant que les deux sont sensibles à l'IDV, alors que tous les échantillons de sérum de volaille testés étaient négatifs pour les anticorps anti-IDV [52].

4.4. Bilan sur les souches circulantes

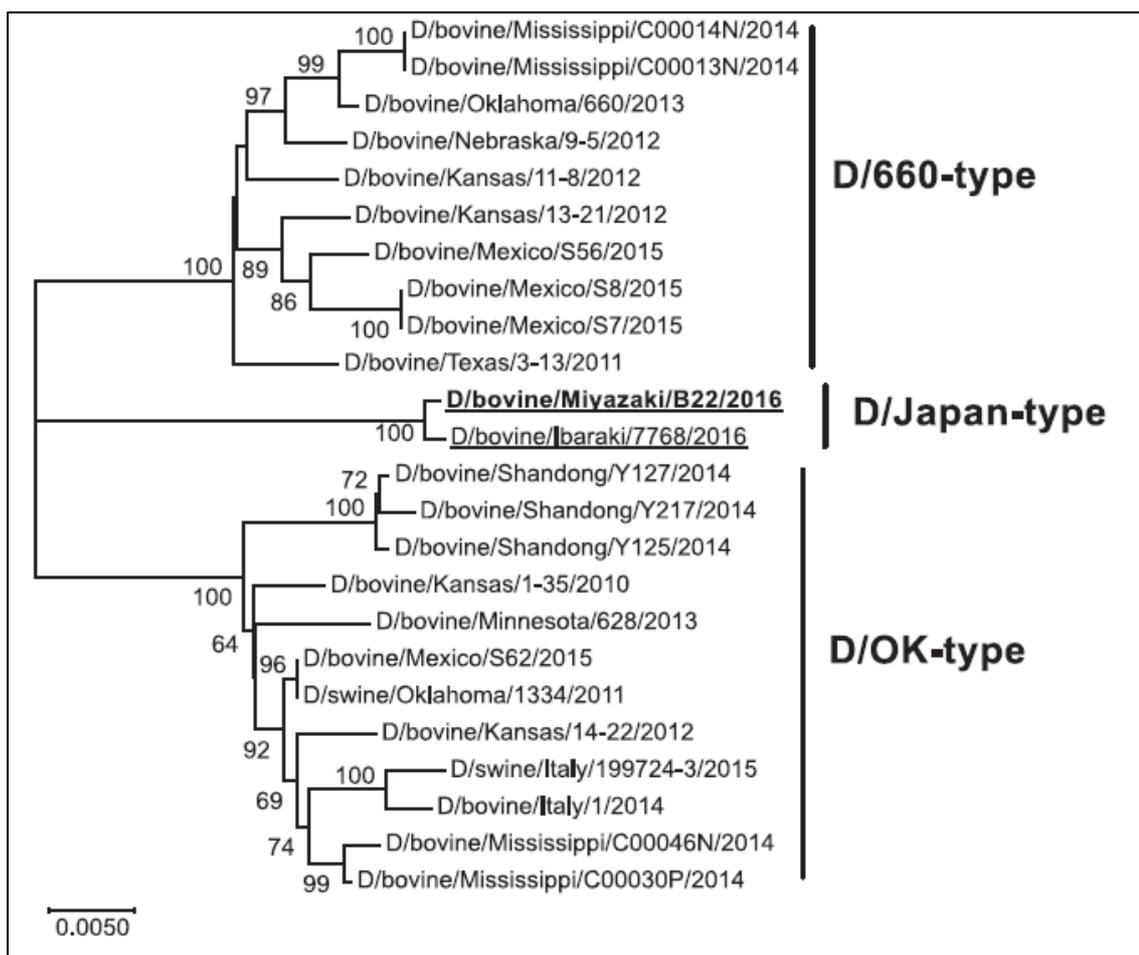


Figure 35. Arbre phylogénétique de l'IDV (source : Mekata et al, 2017)

Comme décrit précédemment, l'IDV présente de nombreuses similitudes avec l'ICV ; on estime que leurs génomes présentent 50% de similarité. En réalité, cela dépend des gènes. Par exemple, les analyses basées uniquement sur PB1 ont révélé

une identité de 70% entre les deux genres. Ainsi, PB1 est la **séquence nucléotidique la plus conservée** parmi les virus Influenza, alors que la région la plus variable est représentée par HEF.

Lors d'analyse des arbres phylogénétiques, les lignées IDV se différencient des souches IAV et IBV, puis des souches ICV, suggérant qu'IDV avait probablement un ancêtre commun avec ICV. Les auteurs ont obtenu les mêmes résultats en comparant les séquences PB2, P3, NP et NS.

Actuellement, deux lignées génétiquement distinctes circulent dans le monde. La première a été isolée chez les porcs et la seconde chez les bovins : elles sont représentées par D/swine/Oklahoma/1334/2011 (D/OK), première lignée d'IDV isolée en 2011 et D/bovine/Oklahoma/660/2013 (D/660). D/OK et D/660 représentent donc deux groupes génétiques distincts, mais ils présentent en même temps une réactivité antigénique croisée et il est rapporté **qu'ils se réassortissent fréquemment l'un avec l'autre**. Il existe ensuite un troisième groupe contenant les deux souches japonaises isolées toutes deux de bovins en 2016 : D/bovine/Ibaraki/7768/2016 et D/bovine/Miyazaki/B22/2016. Cela suggère qu'IDV a évolué de manière différente dans ce pays depuis de nombreuses années. L'arbre phylogénétique (figure 37) basé sur l'analyse HEF montre les trois groupes représentant les trois lignées circulantes connues du virus Influenza D.

4.5. L'homme peut-il être infecté ?

La présence d'anticorps anti-IDV chez des humains, d'autant plus forte quand les humains ont été en contact avec des bovins, suggère que **le virus peut infecter l'homme** [73].

De nombreux arguments renforcent cette idée qu'il est tout à fait possible que l'IDV infecte l'homme. Tout d'abord, contrairement à l'ICV, l'IDV se réplique bien dans des cultures cellulaires dont la température s'élève à 37°C : la température régnant dans les poumons [65]. De même, la cavité de liaison au récepteur est plus ouverte dans la protéine HEF de l'IDV, ce qui suggère que ce virus peut infecter un plus large panel de cellules que l'ICV. En effet, l'HEF de l'IDV se lie à des sections de trachée humaine. Ainsi, il ne semble pas exister de blocage empêchant l'IDV d'envahir les

voies respiratoires inférieures et, pour ce faire, seuls quelques changements génétiques adaptatifs pourraient être nécessaires. Il est donc tout à fait envisageable que l'IDV ait pu acquérir la capacité d'infecter aussi le tractus respiratoire inférieur, créant possiblement des symptômes plus sévères.

Enfin IDV se réplique chez le furet, qui est le modèle d'infection pour étudier les IAV humains.

Toutefois, très peu d'échanges d'acides aminés sont observés entre les protéines des virus circulants (ICV et IDV), laissant penser que l'évolution du virus est lente. De plus, seule la glycoprotéine de surface HEF est antigéniquement stable, ce qui signifie que la production de mutants permettant d'échapper aux anticorps n'est pas fréquente et donc, que l'infection par l'IDV peut entraîner une **immunité durable**.

En résumé, malgré son potentiel zoonotique, l'importance de l'IDV en santé publique semble être assez faible, dû au fait que le potentiel pathogénique et la stabilité antigénique du virus ne change pas beaucoup. Toutefois, puisque les propriétés et changements des virus Influenza sont difficiles à prévoir, une surveillance accrue du virus, surtout chez les hommes, est nécessaire.

PARTIE

EXPERIMENTALE

1. Objectifs

Si les États-Unis sont les premiers à avoir isolé le virus en 2011, de nombreux autres pays ont suivi afin de savoir si le virus était présent dans leurs populations ; c'est le cas de l'équipe virologie (IHVV) de Toulouse en France, qui a décidé de rechercher si le virus était présent dans la population bovine en France. L'absence de détection de pathogènes respiratoires connus lors de BPI, alors que les conditions de prélèvement et d'analyses étaient optimales, suggérait que d'autres virus pouvaient être impliqués, agissant comme agents initiateurs ou comme pathogènes majeurs.

L'IDV a été identifié pour la première fois en France en 2014 ([3] ; thèse vétérinaire Alban Fayel en 2017) à partir de prélèvements respiratoires de jeunes bovins atteints de BPI, obtenus dans le Sud-Ouest et en région Bourgogne. Les premiers résultats indiquaient la présence d'IDV dans 5 prélèvements pulmonaires et un écouvillonnage nasal sur 140 échantillons de Bourgogne, soit une fréquence de détection de 4,8%. De même, IDV a pu être détecté par RT-PCR dans 2,8% des prélèvements du Sud-Ouest. Un isolat a alors été entièrement séquencé. Dans notre étude, nous avons continué ce travail en évaluant d'une part à plus large échelle la prévalence d'IDV chez le veau dans le Sud-Ouest de la France et en caractérisant les génomes des isolats obtenus et d'autre part, en étudiant les éventuelles co-infections.

2. Matériel et méthodes

2.1. Choix des élevages pour les prélèvements

2.1.1. Nombre d'animaux à prélever

Le nombre de prélèvements à effectuer reste sujet à discussion et a fait l'objet de peu d'études. Il dépend des caractéristiques propres à chaque infection (évolution, morbidité) et du type de prélèvement réalisé. Les contraintes techniques (temps pour se rendre sur les exploitations, temps pour réaliser chaque prélèvement, risques liés à la contention des animaux) sont également à prendre en compte.

Initialement, nous avons pour objectif de prélever 50 à 70 veaux par élevage, dans 30 élevages. Finalement, 19 élevages de veaux de boucherie ont été visités et 50 veaux ont été prélevés dans chaque élevage (sauf dans un élevage où seulement 45 veaux ont pu être prélevés).

Suite à la récolte de ces échantillons, et aux vues de nos objectifs, 2 écouillons ont été prélevés sur chaque veau (un par narine).

Ainsi, au total, 1890 écouillons nasaux ont été récoltés.

2.1.2. Moment du prélèvement

Ces élevages ont été visités entre janvier et décembre 2018 : 3 premiers élevages en janvier 2018, 13 élevages en octobre 2018 et 3 élevages en décembre 2018.

2.1.3. Cartographie des prélèvements

Afin d'avoir une couverture géographique assez dispersée, plusieurs départements de la région Occitanie et de la région Auvergne ont été choisis : le Tarn (Occitanie), le Tarn-et-Garonne (Occitanie), l'Aveyron (Occitanie), la Lozère (Occitanie), ainsi que le Cantal (Auvergne).

Néanmoins, nous nous sommes limités au grand Sud-Ouest de la France.

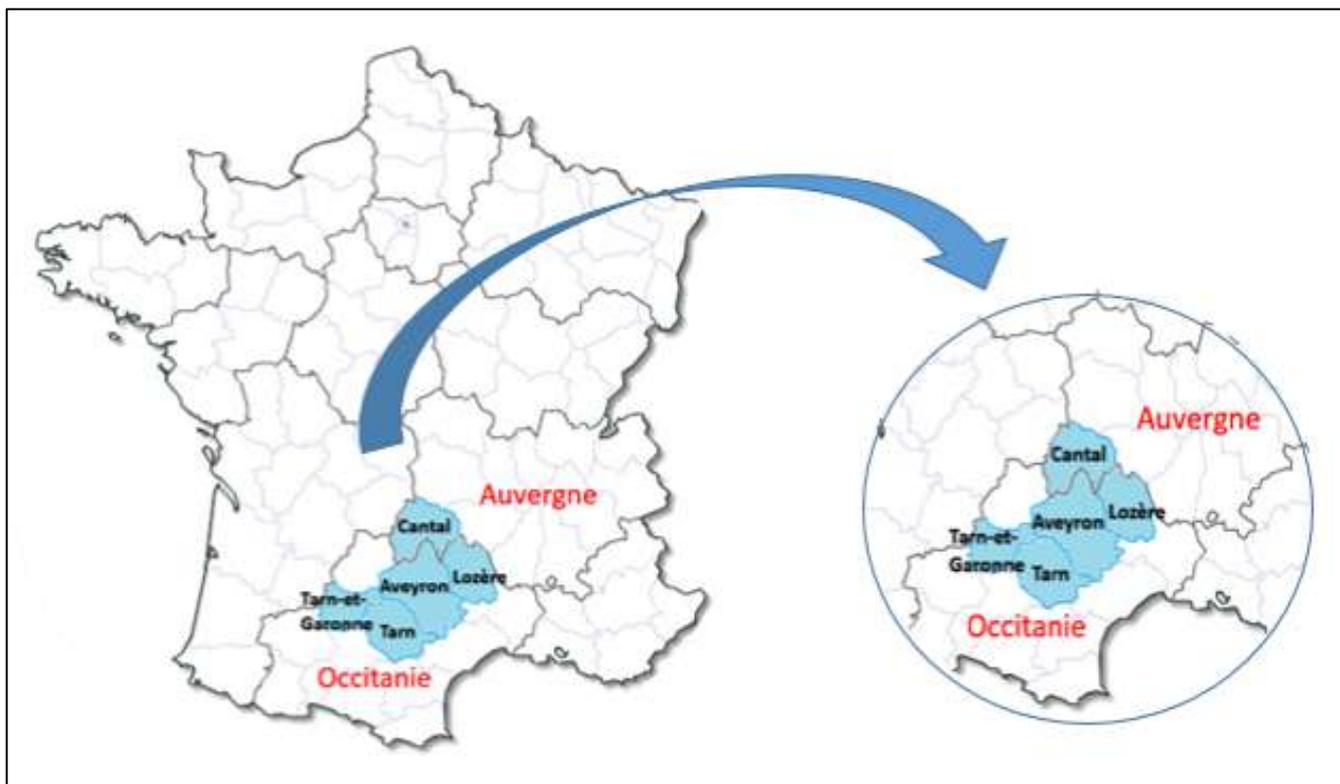


Figure 36. Localisation des prélèvements : département, région (*schéma personnel*)

2.2. Synthèse des élevages visités

Tous les élevages visités étaient des élevages de veaux de boucherie, qui réceptionnent des veaux venant de toutes les régions de France entre 7 et 21 jours, puis qui les nourrissent au lait sur une période variable au maximum 8 mois. La taille moyenne des élevages visités était de 190 veaux par élevage. Nous avons nommé ces élevages de A à S afin de simplifier leur dénomination.

Seuls les élevages Q, R et S visités en décembre 2018 ne figurent pas sur la carte, mais sont détaillés dans la liste des élevages en annexes.



Figure 37. Détails des élevages visités (sauf Q, R, S)

2.3. Caractéristiques des veaux prélevés

Les veaux prélevés étaient âgés d'une semaine à 80 jours, certains présentaient des signes cliniques respiratoires tandis que d'autres étaient en bon état général. Le critère sexe n'a pas été pris en compte.

De manière concomitante ; des renseignements étaient donc demandés à l'éleveur concernant l'épidémiologie de l'infection de chaque élevage : éventuels signes cliniques, éventuelles mortalités, principaux problèmes rencontrés dans l'élevage.

Dans les 3 élevages visités en janvier 2018 (A à C), les veaux étaient âgés de 2 à 4 semaines et chez tous, des signes cliniques respiratoires légers à modérés ont été remarqués. Au total, 290 écouvillons nasaux (EN) ont été réalisés avec 100 EN pour le premier élevage (élevage A), 90 dans le second (élevage B) et 100 dans le dernier (élevage C).

Dans les 13 élevages suivants, très peu de signes cliniques ont été remarqués durant les prélèvements. Ici, 100 EN par élevage ont été prélevés, sur un total de 13 élevages (élevage D à P).

Enfin, dans les 3 élevages visités (élevages Q à S) en décembre 2018, 100 EN ont été collectés dans chaque élevage, sur des veaux tous asymptomatiques.

2.4. Écouvillonnage nasal profond des veaux

Un écouvillon stérile de 20 cm avec embout en coton était utilisé, il comportait un manche en plastique pour éviter qu'il ne se casse en cas de mouvements de l'animal. Pour des veaux âgés de moins de 4 mois, ce qui est le cas dans notre étude, la contention physique de l'animal suffit à la réalisation des ENP.

L'écouvillon était introduit dans la narine de l'animal le plus loin possible vers le méat dorsal puis vigoureusement frotté contre la muqueuse nasale par un mouvement de va-et-vient pendant quelques secondes.

Chaque écouvillon était ensuite coupé à ras et élué dans un tube contenant 1ml de PBS 1X et conservé au froid positif durant le trajet de l'élevage au laboratoire (quelques heures), puis stocké à -80°C jusqu'à analyse.

2.5. Extraction d'ADN

Deux techniques d'extraction d'ARN viral ont été utilisées pour cette étude.

Pour la première série de prélèvements (A à C, janvier 2018) et pour la dernière (Q à S, décembre 2018), le kit d'extraction manuel « QIAamp Viral RNA mini kit » (*Qiagen*) a été utilisé, selon les instructions du fournisseur.

Pour la deuxième série de prélèvements (D à P, octobre 2018), les ARN viraux ont été extraits avec le robot d'extraction « QIAcube HT » (*Qiagen*) et le kit d'extraction « cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit » (*Qiagen*), selon les indications du fournisseur.

Afin de vérifier si la qualité d'extraction d'ARN viral était similaire entre les deux kits, 29 écouvillons nasaux des élevages D à P ont aussi été extraits avec le kit manuel. Nous n'avons pas observé de différence en termes de qualité d'extraction et de positivité en RT-PCRq.

2.6. Amplification du gène PB1 par RT-PCRq

La détection d'IDV a été réalisée par RT-PCRq avec le kit **Quantinova Probe RT-PCR** (*Qiagen*), utilisant la chimie Taqman, (Ducatez et al, 2015), et des amorces et sonde ciblant le gène PB1, décrites ci-dessous (*voir Tableau 7*). Les amorces utilisées ont été conçues pour amplifier une petite portion du gène de la polymérase PB1 (second segment du génome d'IDV), un des gènes les plus conservés au sein des virus Influenza.

L'analyse a été effectuée avec le Light Cycler 96 (*Roche*). Les échantillons présentant des valeurs de Ct (threshold cycle) supérieures à 40 étaient considérés comme négatifs.

D/OK Forw	5'-GCT GTT TGC AAG TTG ATG GG-3'
D/OK Rev	5'-TGAAAG CAG GTA ACT CCAAGG-3'
D/OK Probe	5'-TTC AGG CAA GCA CCC GTA GGA TT-3'

Tableau 7. Amorces utilisées pour la RT-PCR (ciblant le gène PB1)

Pour les élevages A à C, l'intégralité des échantillons a été analysée. Pour les élevages D à T, 14 échantillons ont été sélectionnés au hasard pour être analysés.

2.7. Culture et isolement

Sur certains des prélèvements positifs présentant la valeur de Ct la plus faible (A13, B19, B20), de l'isolement viral sur culture cellulaire a été réalisé. Deux lignées cellulaires ont été utilisées : les cellules HRT-18G (cellules tumorales rectales humaines) et les cellules ST (testicules de porcs). Avant utilisation, chacune des deux lignées cellulaires a été testée pour *Mycoplasma spp.* Les cellules non infectées ont été cultivées sur un milieu DMEM, à savoir un milieu à haute teneur en glucose (Gibco™), supplémenté en pénicilline-streptomycine et 10% de sérum de veau foetal (SVF).

Les écouvillons fortement positifs en IDV, en milieu PBS1X, ont été tout d'abord filtrés avec un filtre de 0,22 µm, puis inoculés en premier passage sur une lignée de cellules hRT-18g confluentes à 80%. Le second passage a été réalisé, en aveugle, sur des cellules ST. Puis, les cellules ont été infectées, avec tous les échantillons en double et dans trois dilutions différentes (1:2, 1:10, 1:50). Les cellules ont été infectées en utilisant le milieu Gibco™ Opti-MEM™ à sérum réduit.

Après une heure d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, le milieu Opti-MEM a été complété avec de la trypsine TPCK (1 µg / ml, Thermo Fisher Scientific, États-Unis), de l'amphotéricine B (2,5 µg / ml, Sigma-Aldrich, États-Unis), de la BM-cycline (15 µg / ml, de Sigma-Aldrich, États-Unis) et de la cyprofloxacin (10 µg / ml, Sigma-Aldrich, USA). Après 4 jours d'incubation dans les mêmes conditions, une partie du surnageant a été recueillie et conservée à -80°C tandis que l'autre partie a été utilisée pour effectuer un second passage sur les cellules.

Le surnageant prélevé après le premier et le second passage a alors été utilisé pour amplifier les sept segments du génome d'IDV.

2.8. Séquençage

Le génome entier (7 segments d'ADN) de l'IDV isolé a été séquencé et caractérisé moléculairement par la méthode de séquençage de Sanger, en utilisant les amorces décrites au tableau 4, sur séquenceur capillaire Applied Biosystems 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, Californie, USA).

Les séquences obtenues ont été vérifiées manuellement avec le logiciel BioEdit v7.1, puis comparées avec les séquences nucléotidiques disponibles sur la base de données GenBank. Des alignements multiples des séquences nucléotidiques ont été générés en utilisant le programme ClustalW sur le logiciel BioEDit, en testant à chaque fois pour chaque gène le meilleur modèle, avant de procéder aux analyses phylogénétiques.

Segment du génome concerné	Amorce utilisée pour l'amplifier
Hemagglutininesterase (HEF)	1F 5'-AGCATAAGCAGGAGATTTTCAAAG-3' 745R 5'-GCACTACATGCTTGTTGC-3' 667F 5'-GTTTGTGGGACTGAGCAATC-3' 1350R 5'- CCCTGCTTGCGGTATTATC-3' 1267F 5-'CCCAAGTATGGCAGATG-3' 2042R 5'- GCAAGGAGATTTTTTCTAAGATT-3'
Matrix (MP)	8F 5'-GCAGAGGATATTTTTGACGC-3' 670R 5'-CCCATATGCTATTCTTGCCAG-3' 602F 5'-AAAAAAGAGGCCAGGCAC-3' 1212R 5'-GCAAGAGGATTTTTTCGCG-3'
Nucleoprotein (NP)	1F 5'-GGCATAAGCAGGAGATTATTAAGC-3' 949R 5'-TAAAGGCTCTTACTCCAGAATA-3' 849F 5'-GCCTTGGTCAATGTGGCTG-3' 1717R 5'-GGGGACTGCAACAGAACCA-3'
Nonstructural protein (NS)	8F 5'-GCAGGGGTGTACAATTTCAAT-3' 804R 5'-TCGAAACTGACTTGATTTTCATCC-3'
Polymerase basic 1 (PB1)	1F 5'-GGCATAAGCAGAGGATTTTAT-3' 736R 5'-TTTTCTCTTTCTCCGTC-3' 631F 5'-AAAAATGAAGTCTCCAACATTG-3' C/OK-Rev 5'-TGAAAGCAGGTAACCTCAAGG-3' C/OK-Fwd 5'-GCTGTTTGCAAGTTGATGGG-3' 2317R 5'-GATTTTTCTGTTATTAACAACGC-3'

<p style="text-align: center;">Polymerase basic 2 (PB2)</p>	<p>1F 5'-GGCATAAGCAGAGGATGTC-3' 882R 5'-CCCTTATCTTCTCTGCTGG-3'</p> <p>796F 5'-AAAAGAAGAGAGATGTTAGAGC-3' 1776R 5'-TTTTACCCATTATCAAAGCAGG-3'</p> <p>1724F 5'-GAAAGAATAAACACTGATGATG-3' 2353R 5'-GAGGATTTTTTCAATGTGCTTC-3'</p>
<p style="text-align: center;">Polymerase 3 (PB3)</p>	<p>1F 5'-GGCATAAGCAGGAGATTTA-3' 759R 5'-TTTTCTTCTAGATGTTCCAGTTGA-3'</p> <p>677F 5'-AAAAGAAATCAGGCTGAATGC-3' 1467R 5'-CCAAACAAACAGTCAGTTGA-3'</p> <p>1394F 5'-CCCGGAAAGGTCAAGATAG-3' 2184R 5'-GGAGATTTTAAACATTACAAGGCC-3'</p>

Tableau 8. Amorces utilisées pour amplifier et séquencer le génome entier d'IDV

2.9. Analyse des co-infections sur différents isolats obtenus

Pour vérifier si l'IDV était présent seul ou en association avec d'autres pathogènes respiratoires, les prélèvements positifs des élevages A, B et C ont été testés au moyen d'un kit PCR multiplex pour les autres pathogènes suivants : VRSB, BPI3, BCoV, *M.haemolytica*, *P.multocida*, *H.somni*, *M.bovis*).

Un premier kit a été utilisé pour détecter BCoV, IDV, VRSB, Pi3 (Quantinova kit) et un deuxième kit a été utilisé pour détecter *M.haemolytica*, *P.multocida*, *H.somni*, *M.bovis* (Biosellal kit), conformément aux instructions du fabricant. Plus de précisions sont apportées dans la première partie.

3. Résultats et discussion

3.1. Viroprévalence de l'IDV

En résumé, 1890 EN (sur 945 veaux) ont été collectés dans 19 élevages Français différents, principalement localisés dans la région Occitanie et Auvergne-Rhône-Alpes, au cours de 3 campagnes différentes dans l'année (Février/Mars 2018 ; Octobre 2018 ; Décembre 2018). Sur ce nombre total d'écouvillons, 383 ont été analysés.

Le virus a été détecté dans les élevages A, B, C, F, G, I, J, K, N et O. Le taux de détection s'est révélé nettement plus important pour les élevages A-C que le reste des élevages. Les valeurs de Ct les plus faibles ont été obtenues pour les élevages A-C également.

Concernant ces trois premiers élevages, nous avons observé un taux de détection de 40%, 89% et 16% pour les élevages A, B et C, respectivement. Les valeurs de Ct variaient également d'un élevage à l'autre, allant de 19,5 à 37,8 (*voir Tableau 9*). L'élevage où IDV a été le plus détecté a été l'élevage B, où quasiment tous les écouvillons se sont révélés positifs pour le virus. De plus, c'est également dans cet élevage que les valeurs de Ct étaient les plus faibles : de 19,5 à 31,1. Les valeurs de Ct et le taux de détection suggèrent que les prélèvements ont été effectués durant la période où IDV était le plus excrété par les veaux. L'élevage C, où IDV a été le moins détecté (16%), est aussi celui qui a présenté les valeurs de Ct les plus hautes (33,7 to 36,6). Le prélèvement a sans doute eu lieu en tout début ou à la fin de l'épisode de circulation d'IDV dans cet élevage.

Concernant les 13 élevages prélevés en octobre 2018, le taux de détection d'IDV s'est avéré beaucoup plus faible, avec seulement 1 veau (élevages F, I, K, N et O) ou 2 veaux (élevages G et J) positifs (7,1 ou 14,3%). En outre, les valeurs de Ct obtenues étaient beaucoup plus importantes que celles observées pour les élevages A, B et C. En effet, la plus faible valeur de Ct était 31,5 et la plus forte 39,8 (élevage J). Enfin, aucune détection d'IDV n'a été observée dans les 3 élevages prélevés en Décembre 2018 (élevages Q-R-S) (*voir Tableau 10*).

	Élevage A	Élevage B	Élevage C
Nombre EN prélevés (Testés)	50 (50)	45 (45)	50 (50)
% détection	40%	89%	16%
Valeurs de Ct	23 à 37,8	19,5 à 31,1	33,7 à 36,6

Tableau 9. Viroprévalence d'IDV dans les élevages A, B et C

	Elv F	Elv G	Elv I	Elv J	Elv K	Elv N	Elv O
Nombre EN prélevés (testés)	50 (14)	50 (14)	50 (14)	50 (14)	50 (14)	50 (14)	50 (14)
% détection	7,1	14,3	7,1	14,3	7,1	7,1	7,1
Valeurs de Ct	37,2	37,1-37,2	37,3	31,5-39,8	37,5	37,6	33,2

Tableau 10. Viroprévalence d'IDV dans les élevages D à T

3.2. Isolement d'IDV et séquences obtenues

Dans cette partie du travail, différents IDV ont été isolés à partir d'échantillons positifs prélevés dans les trois fermes visitées A, B et C. Pour chaque virus, le génome entier a été séquencé en utilisant la technologie de séquençage Sanger. Le génome d'IDV, comme déjà décrit dans le chapitre introductif, est composé de 7 segments de gènes. Les trois premiers segments codent pour le complexe de polymérase (PB1, PB2 et P3), NS pour la protéine non structurale, NP pour la nucléoprotéine, MP pour les protéines formant la matrice et HEF pour l'hémagglutinine fusion estérase, responsable de la liaison virale aux récepteurs et jouant donc un rôle clé dans l'infection des hôtes.

Dans le premier élevage (A), un **seul génome complet de l'IDV** (nommé A13) a été amplifié et séquencé avec succès, car un seul échantillon avait une faible valeur de Ct qui permettait des analyses plus poussées. Un autre échantillon (A31) avait un Ct élevé (= 36,92) et seuls deux segments pouvaient être séquencés, NS et HEF.

Dans le troisième élevage (C), les valeurs de Ct des écouvillons nasaux étaient encore plus élevées et il n'était pas possible d'obtenir un génome complet avec la technologie de séquençage de Sanger ; cependant, pour un échantillon (C3), trois segments ont été séquencés avec succès (NS, MP et HEF).

Pour les échantillons prélevés dans le deuxième élevage (B), les faibles valeurs de Ct et le nombre élevé d'échantillons positifs ont permis d'isoler et de séquencer 4 génomes différents d'IDV complets (B19, B20, B31, B32).

Des analyses phylogénétiques ont été effectuées et des arbres phylogénétiques (voir figure 38 et annexes) produits pour chacun des sept segments d'IDV. Les séquences obtenues ont été alignées sur toutes les séquences disponibles sur GenBank pour chaque gène. Le but des analyses phylogénétiques était de confirmer si ces virus isolés appartenaient au type **D/OK, qui est le seul qui circule actuellement à grande échelle en Europe.**

Tous les segments de tous les IDV caractérisés ici appartiennent au type D/OK si on se réfère aux arbres phylogénétiques. Aucun segment appartenant au type D / 660 n'a été trouvé. En dehors de ce travail, aucun réassortiment n'a été trouvé ni dans l'étude précédente en France [3], ni en Italie et en Irlande. Cela signifie que, jusqu'à présent, aucun réassortiment parmi les lignées IDV n'a été détecté en Europe. Cela contraste fortement avec les résultats obtenus aux États-Unis, où un nombre important de réassortiments parmi les lignées d'IDV a été constaté même dans une cohorte limitée d'échantillons positifs [77].

Par ailleurs, en 2012, en France, un génome différent de ceux que nous avons caractérisés a été identifié ; un deuxième génome a également été découvert en Irlande en 2014, toujours provenant d'un échantillon de l'espèce bovine, suggérant ainsi qu'il pourrait exister en **Europe deux lignées en circulation** : une lignée en circulation importante (type D/OK) et une lignée génétiquement distincte (*également différentes des lignées D / 660 et Japan*) avec seulement deux séquences disponibles pour le moment: D/bovine/France/2986/2012 et D/bovine/Irlande/007780/2014. Il n'a jamais pu être isolé de virus contenant ces séquences.

Aux États-Unis, les types D/OK et D/660 semblent tous deux être présents, et au Japon, tous les IDV isolés semblent appartenir à une autre lignée génétiquement différente des deux autres (type Japon).

Dans les arbres produits dans cette étude, pour la plupart des segments, les souches chinoises d'IDV semblent différer génétiquement du type D/OK et du type D/660 ainsi que du type japonais, formant un groupe différent. Cela n'a toutefois pas été observé pour le gène HEF, par exemple : les isolats IDV détectés dans les provinces du Guangdong et du Shandong sont groupées avec le type D/OK et sont proches génétiquement de l'isolat D/swine/Oklahoma/1334/2011 qui représente le type D/OK. Au contraire, le génome de référence pour le type D/660 est D/bovine/Oklahoma/660/2013.

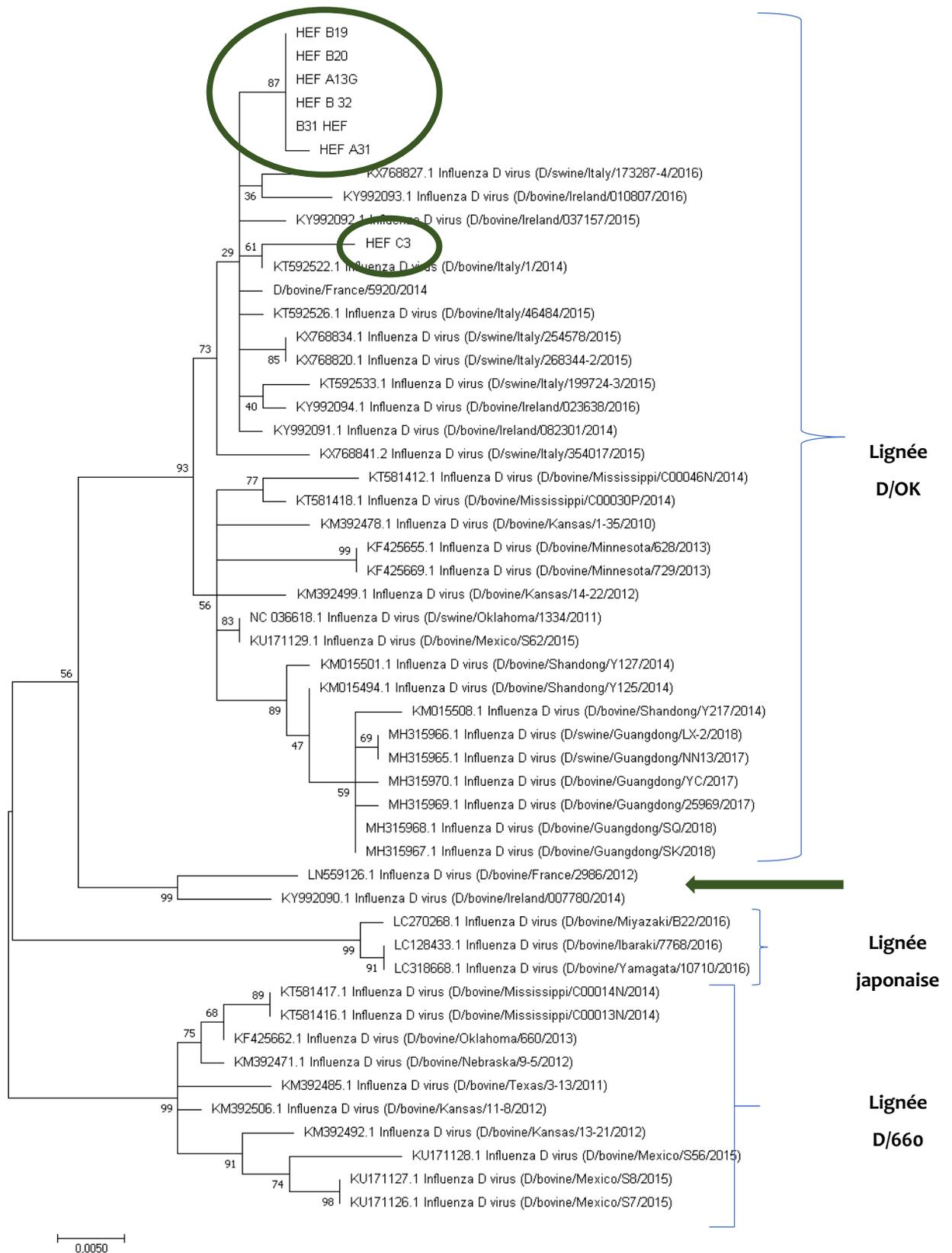


Figure 38. Arbre phylogénétique du segment HEF. Les IDV isolés ici sont entourés en vert. La flèche verte désigne les deux virus français et irlandais différents de la lignée D / OK. Les arbres phylogénétiques restants de tous les autres segments sont disponibles en annexes.

Les modifications au niveau des acides aminés ont également été prises en compte. Les séquences nucléotidiques de l'alignement utilisées pour construire l'arbre phylogénétique HEF ont été traduites en acides aminés ; le but de cette analyse était de voir s'il y avait des changements dans les séquences d'IDV détectées dans les trois élevages A, B et C, par rapport à l'IDV détecté dans le reste de l'Europe et sur les autres continents. De plus, les mutations de HEF au niveau des acides aminés pouvant modifier sa structure (et donc sa virulence) ont également été recherchées.

Dans deux positions sur HEF, une mutation d'acide aminé a été trouvée et elle ne pouvait être référée qu'aux 7 segments HEF séquencés dans ce travail. Ainsi, ces mutations pourraient être considérées comme un marqueur moléculaire des souches d'IDV détectées chez les veaux français en 2018 (*voir Tableau 7*). Aucune différence n'a été constatée entre les IDV séquencés à partir d'ARN viral extrait et les IDV séquencés après avoir été isolés en culture cellulaire ; cela montre que, comme pour ce segment, **aucun changement ne s'est produit au niveau des acides aminés après l'infection des lignées cellulaires**. Au contraire, dans quatre autres positions sur HEF, une mutation d'acide aminé était commune à tous les IDV européens, à savoir des virus détectés en Irlande, en Italie et en France (*voir Tableau 7*). Les seules exceptions étaient les deux souches génétiquement différentes D/bovine/France/2986/2012 et D/bovine/Irlande/007780/2014, montrant ainsi que dans ce cas, cette différence avec les autres isolats européens se produit également au niveau des acides aminés.

Position de l'acide aminé sur le gène HEF	Type de mutation	Spécificité de la mutation
Pos 56	T → I	Veaux en France en 2018
Pos 400	Y → H	Majorité des veaux en France en 2018
Pos 289	A → V	Plupart des IDV européens
Pos 409	K → R	Tous les IDV européens
Pos 563	I → L	Tous les IDV européens
Pos 652	A → V	Tous les IDV européens

Tableau 11. Mutations d'acides aminés dans des génomes isolés d'IDV

Pour les positions 289 et 400, la mutation ne s'est pas produite pour les HEF séquencés de l'exploitation C, ce qui permet donc, d'après les analyses phylogénétiques, de les distinguer génétiquement de l'IDV détecté dans les exploitations A et B.

Le manque de données n'a pas permis de prédire comment ces mutations pourraient affecter HEF, par rapport à d'autres lignées d'IDV de travaux antérieurs. En consultant l'article de Song et al. (2016), qui contient des informations pertinentes sur la structure et l'enchaînement des acides aminés du segment HEF, il semble que les mutations observées sur nos isolats français ne soient pas impliquées dans des modifications particulières de la fonction de HEF et de sa structure effective. Dans notre étude, D/swine/Oklahoma/1334/2011 a été utilisée ; par conséquent, des modifications de la séquence d'acides aminés qui ont affecté la structure de l'HEF auraient pu se produire dans ces IDV nouvellement isolés et provenant de veaux français.

3.3.Caractérisation des lignées obtenues

Des matrices de distance ont été construites afin d'évaluer la distance génétique entre les virus séquencés. L'objectif de ces analyses était notamment de déterminer les différences génétiques entre les virus isolés dans le même élevage, mais également entre les virus isolés de différents élevages. La limite de cette analyse est le faible nombre de génomes séquencés, qui étaient, comme décrit dans le chapitre précédent, sept (dont deux seulement partiels).

Segment	Virus de l'élevage B	Distance génétique	Identité génétique	Virus de l'élevage A	Distance génétique	Identité génétique
MP	B19-B20- B31-B32	0,0%	100%			
NS	B19-B20- B31-B32	0,0%	100%	A13-A31	0,0%	100%
HEF	B19-B20- B31-B32	0,0%	100%	A13-A31	0,2%	99,8%
P3	B19-B20- B31-B32	0,2%	99,8%			
NP	B19-B20	0,3%	99,7%			
PB1	B19-B20	0,4%	99,6%			
PB2	B19-B20	0,8%	99,2%			

Tableau 12. Distances génétiques entre les IDV isolés au sein d'un même élevage

Le tableau ci-dessus montre les résultats de l'analyse de distance génétique basée sur la matrice de distance. Des comparaisons n'étaient possibles que pour les élevages A et B, et dans le cas de l'élevage A, seulement pour les gènes NS et HEF puisque ce sont les seuls à avoir été séquencés à partir de l'échantillon A31. La distance génétique intra-élevage n'a pas été calculée pour l'élevage C car un seul génome y a été séquencé. Les résultats montrent une **très faible variabilité génétique** parmi les virus isolés dans le même élevage et à partir de veaux différents, montrant qu'il y avait probablement le même virus en circulation et infectant les veaux dans le même élevage et non deux lignées au même moment. Dans l'élevage B, les segments les plus variables concernaient les gènes codant pour le complexe polymérase, alors que HEF, NS et MP étaient les plus conservés. Dans l'élevage A également, HEF et NS ont montré une conservation très élevée et une faible distance génétique.

Une comparaison entre élevages a ensuite été réalisée.

Segment	Comparaison entre les élevages	Distance génétique	Identités génétiques
HEF	A-B	0,2%	99,8%
	B-C	1,2%	98,8%
	A-C	1,4%	98,6%
NP	A-B	0,4%	99,6%
P3	A-B	0,4%	99,6%
PB1	A-B	0,4%	99,6%
PB2	A-B	0,6%	99,4%
MP	A-B	0,8%	99,2%
	B-C	0,8%	99,2%
	A-C	0,8%	99,2%
NS	A-B	0,8%	99,2%
	B-C	1,3%	98,7%
	A-C	1,3%	98,7%

Tableau 13. Distances génétiques entre les IDV isolés entre les différents élevages

Le tableau ci-dessus montre les résultats de la comparaison des génomes d'IDV isolés dans différentes fermes en termes de distance et d'identité génétique. Il ressort de l'analyse que les IDV isolés dans les exploitations A et B ne montrent pas une grande variabilité entre eux : les gènes les plus différents (MP et NS) ont une distance génétique de 0,8%, tandis que les gènes HEF sont presque identiques.

Au contraire, lorsque l'on prend en compte les IDV détectés dans l'exploitation C, ceux-ci semblent légèrement différents de ceux des exploitations A et B. Cette différence peut être observée dans les valeurs soulignées dans le tableau ci-dessus et le même résultat ressort également de l'analyse phylogénétique. Lors de cette analyse, un seul génome partiel a toutefois été séquencé pour l'élevage C, à savoir les segments MP, HEF et NS. MP montre la même variabilité entre les trois élevages, mais HEF et NS de l'élevage C se distinguent clairement génétiquement des mêmes segments des deux autres élevages.

Cela signifie que, comme pour ces résultats partiels, les virus IDV des élevages A et B sont très similaires et que, dans l'arbre phylogénétique, on peut observer qu'ils appartiennent au **même groupe**. Cependant, l'IDV isolé de l'élevage C semble être génétiquement différent, même s'il appartient toujours à la lignée de type D / OK. Cette différence peut être vue sur l'arbre représentant l'analyse phylogénétique du fragment NS (*voir figure 40*).

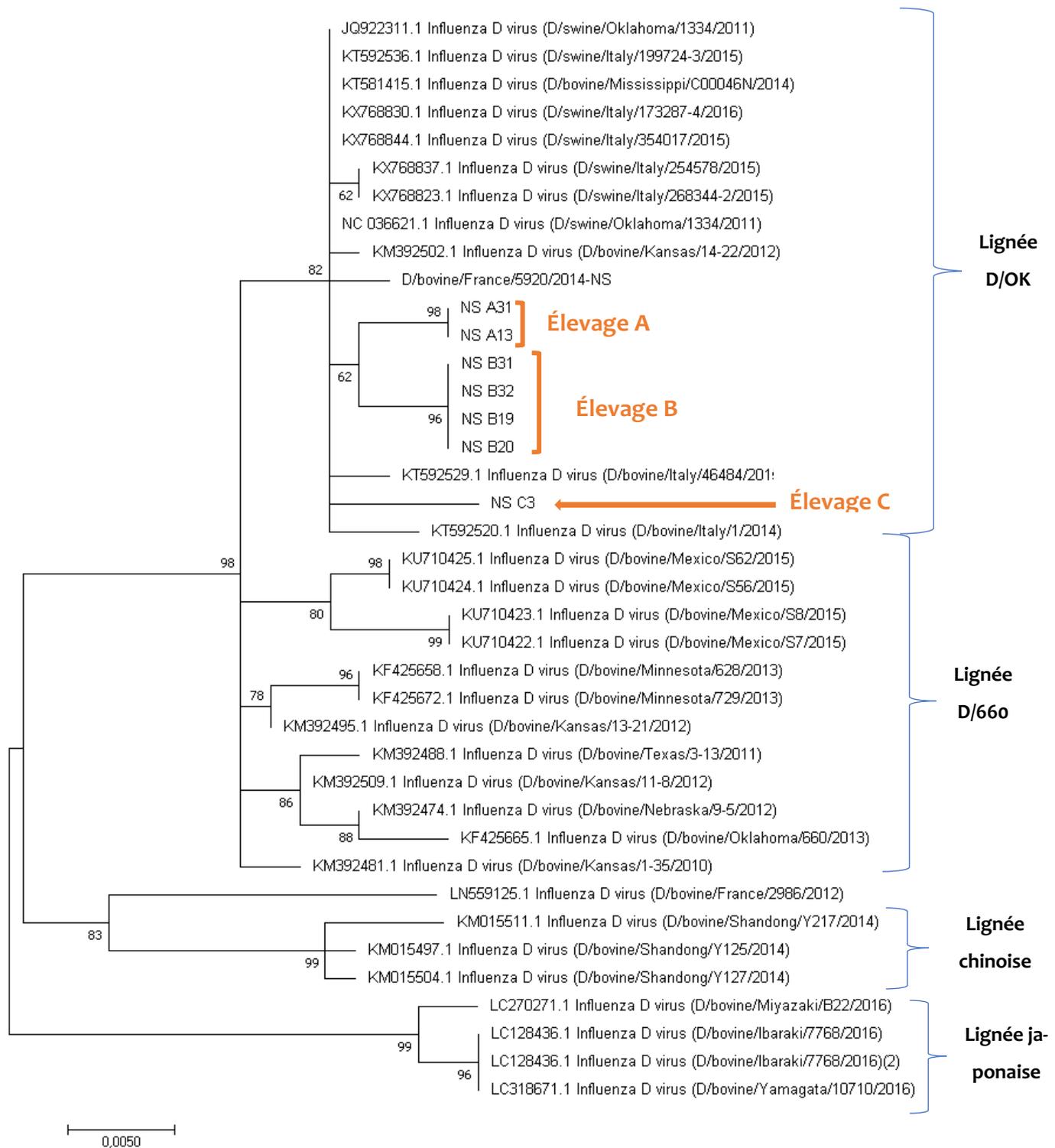


Figure 39. Arbre phylogénétique du segment NS

3.4. Co-infections

A l'aide des 2 kits précédemment décrits, 47 échantillons positifs à l'IDV ont été testés pour les autres pathogènes respiratoires. Les analyses ont permis de mettre en évidence une détection de ***M. bovis*** dans **100%** des échantillons testés, et ce, peu importe la valeur du seuil de détection (qu'on prenne un Ct inférieur à 35 ou inférieur à 40).

De même, si l'on prend un seuil Ct < 40, on détecte le **BCoV dans près de 98%** des échantillons positifs à l'IDV. En revanche, le VRSB, *H.somni* et *M. haemolytica* ont été très peu détectés avec des pourcentages de détection variant de 2,1% à 8,9%.

Enfin, le virus Pi3 a été détecté dans près de 25% des échantillons positifs à l'IDV. Les résultats sont détaillés en annexes.

		BCov	IDV	BRSV	Pi3	<i>M. bovis</i>	<i>H. somni</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>
% détection	seuil Ct ≤ 40	97,9	95,8	8,9	24,4	100,0	2,1	4,2	100,0
	seuil Ct ≤ 35	89,6	8,5	2,2	1,6	100,0	2,1	2,1	100,0

Tableau 14. Bilan des résultats de PCR Multiplex

Ces résultats nous permettent également d'apprécier la sensibilité de la PCR Multiplex par rapport à une PCR individuelle. Par définition, la sensibilité d'un test est la probabilité que le test soit positif si la maladie est présente, son calcul est donné par : $VP / VP + FN$ où VP représente les vrais positifs, et FN les faux négatifs.

Ici, nous pouvons faire une approximation de ce calcul en prenant pour VP le pourcentage de positifs détectés par la PCR individuelle et pour FN la différence entre le pourcentage de positifs détectés par la PCR individuelle et ceux détectés par la PCR Multiplex. On obtient grâce à ce calcul une sensibilité moyenne de 98% sur tous les échantillons testés ici.

4. Conclusion générale et perspectives

Cette étude réalisée en 2018 a permis une caractérisation moléculaire complète d'IDV, par isolement viral à partir d'écouvillons nasaux prélevés dans des élevages de veaux de boucherie. Le choix des élevages de boucherie reposait sur deux critères. Le premier était que ces élevages réceptionnent en un temps donné un nombre important de veaux provenant de régions différentes. L'allotement et la mixité des veaux devait ainsi favoriser l'infection et nous donner plus de chances pour détecter et isoler IDV. Le deuxième était purement technique car il nous permettait d'accéder à un grand nombre de veaux à des périodes différentes dans l'année. Nos résultats indiquent qu'IDV circule actuellement chez les veaux français de boucherie. **Toutefois**, notre étude présente de nombreuses limites qui ne nous permettent pas d'étendre nos résultats à l'ensemble des troupeaux bovins présents sur le territoire français. Premièrement, notre cadre s'est limité aux veaux de boucherie, et à deux régions du sud-Ouest (Occitanie-Auvergne). Par ailleurs, nos prélèvements n'ont été réalisés qu'en 2018 donc nous n'avons pas de comparaison historique possible. Notre étude a aussi été limitée par le très faible nombre d'échantillons positifs à l'IDV sur le nombre total d'échantillons testés.

Quoiqu'il en soit, nous avons aussi observé une différence de prévalence entre élevages de veaux de boucherie lors de ce travail, avec de fortes prévalences pour les élevages A, B et C. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différences.

Premièrement, nos prélèvements se **sont limités à la période automne-hiver**, avec trois moments distincts : octobre (mi-automne), début décembre (fin automne), et février (mi-hiver). Le bilan annuel Météo France souligne que les températures ont été nettement supérieures aux moyennes usuelles pour les mois d'octobre et décembre, mois au cours desquels la deuxième et la troisième série de prélèvements ont été réalisées, et pour lesquels les échantillons ont été très faiblement positifs pour l'IDV, voire pas du tout. En revanche, pour le mois de février, on constate que la température moyenne était de 3,5°C, soit une température nettement inférieure, coïncidant avec davantage de prélèvements positifs pour IDV.

Aux vues de nos résultats et en comparaison avec les températures de chaque période concernée, il semblerait que l'IDV soit davantage présent lorsque les températures sont basses. Ces résultats sont tout à fait cohérents puisque l'on sait que la transmission des virus Influenza est favorisée par des conditions météorologiques froides et humides [55].

Mois	Température moyenne en France
Février	3,5°C
Octobre	14,4°C
Décembre	7,7°C

Tableau 15. Bilan climatique (températures) annuel pour les trois mois qui concernent nos prélèvements (d'après MétéoFrance)

Le deuxième facteur est lié à la **conduite d'élevage et au bâtiment**. Dans les divers élevages de veaux de boucherie que nous avons visités, la répartition des animaux était variable. En effet, dans les élevages A et B, les veaux étaient dans des parcs paillés d'environ 20m sur 20m où on trouvait une vingtaine de veaux mélangés, tandis que dans l'élevage C, les veaux étaient en cases individuelles sur caillebotis. Pour les autres élevages, allant du D au S, les veaux étaient soit en cases individuelles sur caillebotis, soit en cases collectives sur caillebotis, selon l'âge des veaux.

Élevage concerné	Répartition des veaux au sein du bâtiment
A et B	Parcs paillés 20x20m pour environ 20 veaux
C	Cases individuelles sur caillebotis
D à S	Cases individuelles ou collectives sur caillebotis

Tableau 16. Répartition des veaux en fonction des élevages visités

Comme vu précédemment, les cases collectives sur caillebotis sont obtenues par le retrait des barrières des cases individuelles, constituant alors des lots d'une dizaine de veaux à chaque fois. Or, nous avons observé un taux de détection d'IDV de 40%, 89% et 16% respectivement pour les élevages A, B et C, tandis qu'IDV était quasiment absent des autres élevages D à S. Cela souligne l'importance de la répartition et du mélange des animaux mais également l'environnement. De grands parcs à veaux avec un nombre important d'animaux sembleraient être plus propices à la présence et au développement d'IDV.

Enfin le troisième facteur concerne le **délai entre l'allotement et les prélèvements**. Si l'on suppose que l'allotement est une source majeure de contamination et transmission du virus, il apparaît évident que la période de prélèvements optimale se situe dans les quelques jours qui suivent. Cependant, nous n'avons pas pu étudier ce facteur de risque car nous n'avons pas noté cette information lors de nos prélèvements.

Si l'on s'intéresse maintenant au pouvoir pathogène d'IDV, les élevages qui présentaient des veaux cliniques au niveau respiratoire sont ceux pour lesquels on a détecté le plus de virus, laissant supposer un rôle pathogène d'IDV. Toutefois le nombre limité d'élevages testés (19) ne nous permet pas de confirmer statistiquement cette hypothèse. Par ailleurs deux facteurs doivent être pris en compte. Premièrement, tous nos prélèvements se sont limités à des **écouvillons nasaux profonds** qui ont pour inconvénients de cibler le secteur naso-pharyngé et aussi d'être contaminés par la flore commensale, en comparaison avec l'ATT et le LBA (*voir tableau 17*).

	Avantages	Inconvénients
Écouvillonnage nasal profond	Simplicité et rapidité Contention aisée Mélange possible Coût Technique non invasive	Contamination par la flore bactérienne commensale Secteur naso-pharyngé : imputabilité diagnostique pour une infection du tractus respiratoire profond ?
Aspiration Trans-trachéale	Contention aisée Secteur trachéo-bronchique	Technique invasive Faible volume récolté Coût
Lavage broncho-alvéolaire	Contention Secteur bronchique et alvéolaire Volume récolté Peu de contamination bactérienne Mélange possible	Méthode invasive Peu rapide Coût

Tableau 17. Comparaison des méthodes de prélèvement

Peu d'études ont permis de comparer ces techniques entre elles, et pour les troubles respiratoires dus à des virus, il n'a pas été montré de différences entre l'ENP et l'ATT [74]. Toutefois il est difficile d'imputer la présence de troubles respiratoires pulmonaires sans détection du virus dans l'appareil respiratoire profond. Une étude expérimentale récente [78] a montré qu'IDV était capable d'induire des signes cliniques respiratoires modérés chez des veaux naïfs et de se répliquer dans les appareils respiratoires superficiel et profond. Cela suggère que nos animaux testés positifs en écouvillons nasaux profonds pourraient aussi avoir été infectés dans l'appareil pulmonaire. A l'inverse, une étude récente de séroprévalence [73] montre une forte prévalence des infections à IDV dans les élevages bovins français, laissant suggérer un rôle pathogène modéré d'IDV dans la mesure où sa fréquence de détection lors de BPI est faible. Étant donné qu'IDV a été isolé il y a quelques années seulement, on pourrait soutenir l'hypothèse que son potentiel pathogène est plutôt limité. Cependant, on pourrait aussi imaginer que le virus pourrait ne se soit étendu aux porcs et aux bovins que récemment, probablement à partir d'un autre **réservoir animal naturel** encore inconnu à ce jour. Si on considère, de plus, le rôle supposé du porc comme

« mélangeur » pour le réassortiment des virus Influenza aviaire et humain afin de générer des virus génétiquement nouveaux, souvent pandémiques, on pourrait tout à fait envisager que les **porcs jouent un rôle similaire dans l'écologie des IDV**. Étant donné que les porcs sont sensibles à la fois à l'ICV et à l'IDV, il est conseillé de surveiller en permanence les porcs pour suivre d'éventuels réassortiments d'IDV. On ne sait pas non plus s'il y a davantage de virus au génotype similaire à l'IDV qu'à l'ICV, circulant chez les bovins et autres hôtes.

Le deuxième facteur à prendre en compte dans l'expression clinique d'IDV concerne les co-infections puisque nous avons mis en évidence dans notre étude la présence systématique de *M. bovis* et du coronavirus bovin en association avec IDV. Cela confirme des données préalables de terrain qui montrent l'importance des co-infections dans les BPI. Le coronavirus bovin est le virus le plus fréquemment détecté lors de BPI mais très fréquemment en association avec d'autres pathogènes et son pouvoir pathogène n'a jamais été clairement montré en conditions expérimentales. *M. bovis* est une bactérie qui possède un pouvoir pathogène respiratoire reconnu depuis quelques années mais on ne sait pas si elle intervient seule ou en association avec d'autres agents respiratoires. Auparavant, une seule étude s'est intéressée aux co-infections concomitantes à IDV, en évaluant plus précisément la pathogenèse d'IDV en synergie avec *M. haemolytica* chez des bovins co-infectés [79]. Ainsi, 16 veaux laitiers ont été répartis en 4 groupes et ont ensuite été infectés soit avec IDV seul, soit avec à la fois IDV et *M. haemolytica*, soit avec *M. haemolytica* seule, soit avec aucun agent pathogène. Aucune différence significative concernant la clinique et la pathogénie n'ont été mises en évidence. En revanche, cette étude a montré qu'en conditions expérimentales, l'infection par IDV avant *M. haemolytica* ne réduisait ni les signes cliniques ni les lésions pulmonaires par rapport à une infection par *M. haemolytica* seule.

Récemment l'équipe de virologie de Toulouse a réalisé en conditions expérimentales une co-infection de veaux naïfs par IDV et *M. bovis*. Les premiers résultats montreraient qu'IDV module la réponse immunitaire de l'hôte et favorise la virulence de *M. bovis* (travaux en cours de finalisation sur une autre thèse). D'une manière générale la compréhension des mécanismes d'interaction entre pathogènes respiratoires, qui plus est dans un environnement microbien (microbiote), est un axe de recherche majeur pour mieux comprendre la genèse des BPI et trouver des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques. La pertinence de l'IDV pour la médecine vétérinaire

doit donc être approfondie, c'est-à-dire que ce qu'il nous reste à déterminer de plus important est la capacité ou non du virus à provoquer une maladie seule ou uniquement dans le cadre des BPI.

Enfin, nous avons constaté que les souches isolées dans notre étude étaient phylogénétiquement proches des souches européennes, et ne présentaient pas de réassortiments (D/OK-like). Ainsi, selon les souches trouvées, on peut se poser la question de l'impact d'échanges de bovins intra-Europe sur la diversité des souches d'IDV rencontrées. Or, ici, nous nous sommes limités aux veaux de boucheries, qui viennent tous strictement d'élevages français, et nous ne pouvons donc pas nous intéresser à ce point. Malgré cela, deux virus diffèrent de tous les IDV détectés en Europe jusqu'à présent, à savoir D / bovine / France / 2986/2012 et D / bovine / Irlande / 007780/2014. Ces deux virus ne se regroupent pas complètement avec les virus de type D / OK, mais ils appartiennent au même groupe phylogénétique, malgré la distance génétique relativement élevée. Nous pouvons donc nous demander comment cette souche a pu être présente en Europe, et si un autre hôte que le bovin ne pourrait pas être impliqué dans la transmission (comme nous l'avons déjà évoqué dans les paragraphes précédents). Toutefois, en l'absence d'isolement du virus, on ne peut confirmer son infectivité et sa réalité épidémiologique sur le terrain.

Conclusion générale

Notre étude a permis la détection d'IDV en France, dans le Sud-Ouest de la France essentiellement en février 2018 en région Occitanie, avec une viroprévalence élevée dans trois élevages de veaux différents. L'excrétion virale élevée détectée à partir d'écouvillons nasaux profonds prélevés suggère que ce virus pourrait avoir un tropisme particulier pour les jeunes veaux. La lignée du virus isolé est de type D / OK et ce dernier présente une identité génétique élevée avec un IDV détecté dans le nord de l'Italie. Aucun réassortiment avec d'autres lignées d'IDV n'a été trouvé.

De nombreux points relevés dans notre étude restent donc à éclaircir et davantage de prélèvements sont à réaliser ; à la fois dans d'autres régions, mais aussi possiblement dans les mêmes élevages que nous avons visités afin de pouvoir effectuer une comparaison entre saisons (contraste été/hiver) mais aussi pour pouvoir comparer avec les prélèvements plus anciens. Il serait aussi intéressant de comparer des élevages dans lesquels les échanges européens sont plus ou moins importants. Enfin, serait également intéressant d'étudier d'autres espèces afin d'avoir une idée de la diversité génétique de l'IDV et de trouver potentiellement une espèce chez laquelle IDV est capable de se réassortir.

Bibliographie

- [1] B. M. Hause *et al.*, “Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine : Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family,” *MBio*, vol. 5, no. 2, pp. 1–10, 2014.
- [2] T. Horimoto *et al.*, “Nationwide Distribution of Bovine Influenza D Virus Infection in Japan,” *PLoS One*, pp. 1–7, 2016.
- [3] M. F. Ducatez, C. Pelletier, and G. Meyer, “Influenza D Virus in Cattle , France , 2011 – 2014,” *emer*, vol. 21, no. 2, pp. 2011–2014, 2015.
- [4] Collectif, *Maladie des bovins - 4ème édition*, France Agr. 2008.
- [5] I. Veissier, G. Bertrand, and R. Toullec, *Le veau de boucherie*, INRA Editi. 2003.
- [6] A. M. Healy and M. L. Monaghan, “Morbidity and mortality in a large irish feedlot; microbiological and serological findings in cattle with acute respiratory disease,” *Br. Vet. J.*, vol. 149, no. 6, pp. 549–560, 1993.
- [7] N. Bareille, “Evaluation des conséquences économiques des BPIE chez les bovins en engraissement.,” *Bull. des GTV*, pp. 61:63-68, 2011.
- [8] Q. J-m, U. M. R. B. Epid, L. Roche, and N. Le Dolent, “Impact technique et économique des troubles respiratoires des jeunes bovins lors de l’engraissement : Impact of respiratory disorders in young bulls during their fattening period on performance and profitability,” *Rencontre autour des Rech. sur les ruminants*, vol. 15, no. 1, pp. 77–80, 2008.
- [9] B. Mounaix *et al.*, “Description de la mortalité des veaux dans les exploitations françaises d ’ élevage de bovins allaitants Description of calf mortality in French suckling beef cattle farms,” in *Rencontre autour des recherches sur les ruminants*, 2011, no. 18, pp. 267–270.
- [10] L. D. Warnick, “The relationship of calfhood morbidity with survival after calving in 25 New York Holstein herds,” *Prev. Vet. Med.*, vol. 31, pp. 263–273, 1997.
- [11] G. A. Donovan, I. R. Dohoo, D. M. Montgomery, and F. L. Bennett, “Associations

- between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida , USA,” *Prev. Vet. Med.*, vol. 34, pp. 31–46, 1998.
- [12] S. F. Meyer G., Maillard R., Corbière F., Foucras G., “Prélèvements en pathologie respiratoire et incidence du diagnostic étiologique sur les résultats,” *Bull. des GTV*, vol. 61, pp. 27–36, 2011.
- [13] S. Razin and L. Hayflick, “Highlights of mycoplasma research--an historical perspective.,” *J. Int. Assoc. Biol. Stand.*, vol. 38, pp. 183–190, 2010.
- [14] F. Tarqy, M. Coudert, and E. Guérin, “Epidémiosurveillance des deux principales pasteurelles isolées en pathologie respiratoire bovine.,” *Bull. des GTVI*, vol. 10, pp. 271–274, 2001.
- [15] T. G. Kimman, G. M. Zimmer, F. Westenbrink, J. Mars, and E. van Leeuwen, “Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease.,” *Vet. Rec.*, vol. 123, no. 4, pp. 104–109, 1988.
- [16] A. D. Van Den Hoogen, B.G., De Jong, J.C., Groen, J., Kuiken, T., De Groot, R., Fouchier, R.A. and Osterhaus, “A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease.,” *Nat. Med.*, vol. 7, pp. 719–724, 2001.
- [17] J.-F. Valarchera and G. Taylor, “Bovine respiratory syncytial virus infection,” *Vet. Res.*, vol. 38, pp. 153–180, 2007.
- [18] N. Krešić and T. Bedeković, “Bovine respiratory syncytial virus infection,” *Vet. stanica*, vol. 50, no. 1, 2019.
- [19] E. M. VAN DER POEL WHM, “Epidémiologie des infections dues au virus respiratoire syncytial bovin: conséquences sur les différents types de productions bovines.,” *Comptes rendus du Congrès la S.F.B.*, p. 8896, 1997.
- [20] “GDS Occitanie - Bilan IBR de campagne 2017-2018,” *GDS occitanie* : https://www.frgds-occitanie.fr/IMG/pdf/bilan_ibr_de_campagne_2017-2018_pour_cropsav-2.pdf .
- [21] D. G., P. M., M. A., and F. M., “La rhinotrachéite bovine infectieuse.,” *Rec. Méd.*

- Vét., vol. 161, no. 12, pp. 1069–1074, 1985.
- [22] G. S. THIRY E, LEMAIRE M, SCHYNTS F, MEYER G, DISPAS M, “Les conséquences de l’infection des bovins par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine.,” *Le Point Vétérinaire*, vol. 30, no. 199, pp. 279–286, 1999.
- [23] P. Pastoret, A. AGUILAR-SETIEN, and F. SCHOENAERS, “Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovin Herpesvirus 1),” *Ann. Médecine Vétérinaire*, vol. 122, no. 371–391, 1978.
- [24] E. THIRY, M. LEMAIRE, F. SCHYNTS, N. VANDERHEIJDEN, G. MEYER, and M. DISPAS, “La rhinotrachéite infectieuse bovine: l’infection, ses manifestations.,” *Comptes rendus des journées Natl. des G.T.V.*, pp. 279–284, 1997.
- [25] E. Lange, “Le recours au laboratoire dans le cadre de la pathologie respiratoire des bovins : exemples du BRSV et du BHV1.,” 1995.
- [26] P. Remer, “Intérêt de l’utilisation des lavages broncho-alvéolaires dans le diagnostic des broncho-pneumonies infectieuses enzootiques des bovins à travers les différentes techniques et leur évolution.,” p. 99, 1997.
- [27] E. Stott, L. Thomas, A. Collins, and S. Crouch, “A survey of virus infections of respiratory tract of cattle and their association with disease.,” *J. Hyg. Cambridge*, vol. 85, pp. 257–271, 1980.
- [28] C. Bosgiraud and J. Nicolas, “Pneumonie à coronavirus chez les bovins. A propos de deux observations.,” *Rec. Méd. Vét.*, vol. 162, pp. 1085–1086, 1986.
- [29] G. Wellmans, E. Van Opdenbosch, J. Oudgwater, and R. Pattin, “Intervention du virus Corona dans un cas de pneumonie chez les bovins.,” *Ann. Médecine Vétérinaire*, vol. 129, pp. 585–587, 1985.
- [30] D. Mattson, B. Norman, and J. Dunbar, “Bovine Adenovirus type 3 infection in feedlot calves.,” *Am. J. Vet. Res.*, vol. 49, no. 67–72, 1988.
- [31] E. Thiry, P. Pastoret, M. Dispas, C. Hamers, M. Lambot, and C. Lecomte, “Le rôle de la vaccination dans la prévention des maladies respiratoires d’origine

- virale chez les bovins.,” *Comptes rendus du Congrès la S.F.B. Paris*, pp. 278–299, 1997.
- [32] M. Fedida, M. Perrin, A. Moussa, M. Coudert, B. Perrin, and G. Dannacher, “Les virus associés aux maladies respiratoires des bovins.,” *Comptes rendus du Congrès la S.F.B. Paris*, pp. 47–57, 1988.
- [33] F. Schelcher, J. Valarcher, H. Navetat, and J. Espinasse, “Aspects cliniques de l’infection des bovins par le virus de la maladie des muqueuses (BVDV),” *Bull. des GTVII*, vol. 4, p. 2332, 1993.
- [34] E. Thiry, “Spécificité et diversité virales: implications en médecine vétérinaire.,” *Bull. des GTV*, vol. Hors-Série, pp. 11–19, 2008.
- [35] J. M. Walker and R. Rapley, *Molecular Biomehtods Handbook*, Humana Pre. 2008.
- [36] D. Tagu, *Principes des techniques de biologie moléculaire*, INRA Editi. 1999.
- [37] C. Pasquier, S. Bertagnoli, F. Messud-Petit, and J. Izopet, *Virologie humaine et animale*, DUNOD. Sciences Sup, 2005.
- [38] D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds., *Fields Virology - Fifth Edition Volume II*, Lippincott. Wolters Kluwer.
- [39] N. J. Machlan and E. J. Dubovi, Eds., *Fenner’s Veterinary Virology - Fourth Edition*, Elsevier I. 2011.
- [40] M. Shaw and M. Palese, *Orthomyxoviridae: The Viruses and their Replication.*, Fields Vir. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [41] I. Wilson, J. Skehel, and D. Wiley, “Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.,” *Nature*, vol. 289, no. 5796, pp. 366–73, 1981.
- [42] W. Colman, J. Varghese, and W. Laver, “Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase.,” *Nature*, vol. 303, no. 5912, pp. 41–44, 1983.
- [43] S. Zebedee and R. Lamb, “Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody

- restriction of virus growth and detection of M2 in virions.," *J. Virol.*, vol. 62, no. 8, pp. 2762–2772, 1988.
- [44] N. M. Bouvier and P. Palese, "THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES," *Vaccine*, vol. 26, no. Avril, 2011.
- [45] J. Couceiro, J. Paulson, and L. Baum, "Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity.," *Virus Res.*, vol. 29, no. 2, pp. 155–165, 1993.
- [46] M. Matrosovich, T. Matrosovich, T. Gray, N. Roberts, and H. Klenk, "Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, no. 13, pp. 4620–4624, 2004.
- [47] B. Murphy, V. Hinshaw, D. Sly, W. London, N. Hosier, and F. Wood, "Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys.," *Infect. Immun.*, vol. 37, no. 3, pp. 1119–26, 1982.
- [48] A. Beare and R. Webster, "Replication of avian influenza viruses in humans.," *Arch. Virol.*, vol. 119, pp. 37–42, 1991.
- [49] K. Martin and A. Helenius, "Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus.," *J. Virol.*, vol. 65, pp. 232–244, 1991.
- [50] S. Sullivan, "2009 H1N1 Influenza," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 85, no. 1, pp. 64–76, 2010.
- [51] F. Dawood, "Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 25, pp. 2605–2615, 2009.
- [52] S. Su, X. Fu, G. Li, F. Kerlin, and M. Veit, "Novel Influenza D virus : Epidemiology , pathology , evolution and biological characteristics," *Virulence*, vol. 8, no. 8, pp. 1580–1591, 2017.
- [53] Y. Matsuzaki, N. Katsushima, Y. Nagai, M. Shoji, and T. Itagaki, "Clinical features of influenza C virus infection in children.," *J. Infect. Dis.*, vol. 193, no. 9, pp. 1229–35, 2006.

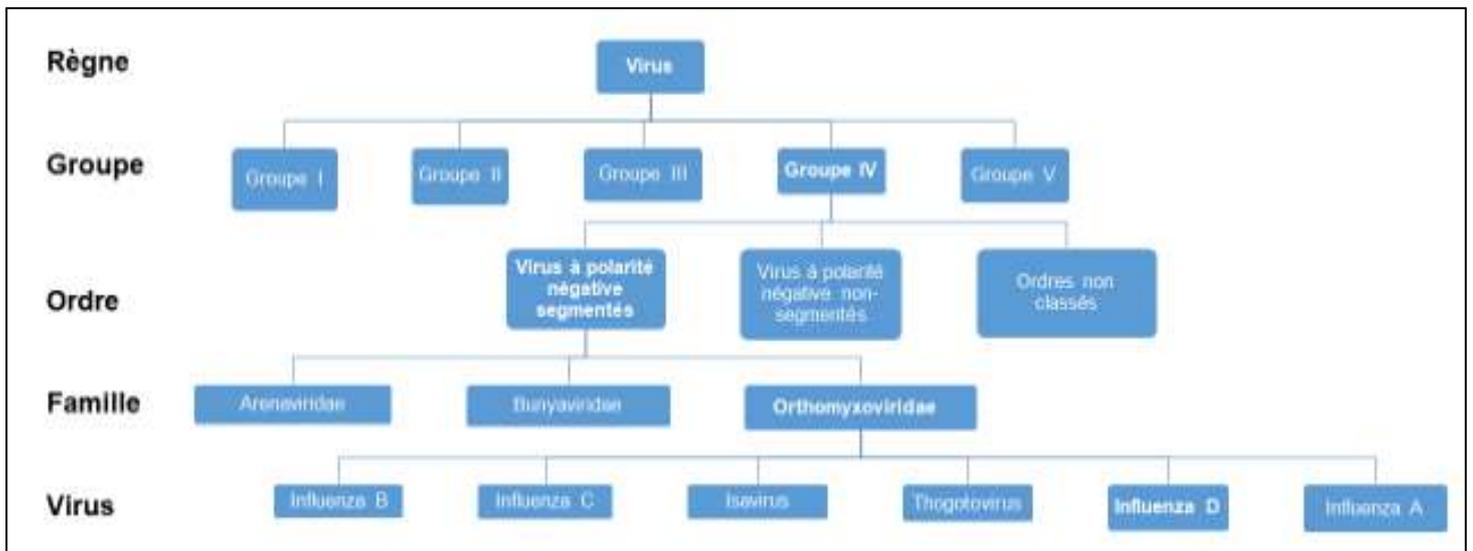
- [54] G. Peng and H. Kimura, "Interspecies transmission of influenza C virus between human and pigs," *Virus Res.*, vol. 48, pp. 71–79, 1997.
- [55] L. AC., M. S., S. J., and P. P., "Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature.," *PLOS Pathog.*, vol. 3, no. 10, pp. 1470–1476, 2007.
- [56] K. Saito, "An outbreak of cattle influenza in Japan in the fall of 1949.," *J Am Vet Med Assoc.*, vol. 118, pp. 316–319, 1951.
- [57] J. W. Lopez and G. T. Woods, "Influenza virus in ruminants: A review.," *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, vol. 45, pp. 445–462, 1984.
- [58] J.ROMVÁRY, G. TAKÁTSY, K. BARB, and E. FARKAS, "Isolation of Influenza Virus Strains from Animals.," *Nature*, vol. 193, pp. 907–908, 1962.
- [59] M. Fatkhuddinova, A. Kir'ianova, V. Isachenko, and L. Zakstel'skaia, "Isolation and identification of the A-Hong Kong (H3N2) virus in respiratory diseases of cattle.," *Vopr. Virusol.*, vol. 18, pp. 474–478, 1973.
- [60] J. Tanyi, J. Romvary, P. Aldasy, and Z. Mathe, "Isolation of influenza a virus strains from cattle. Preliminary report.," *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, vol. 24, pp. 341–343., 1974.
- [61] I. H. Brown, T. . Crawshaw, P. A. Harris, and D. J. Alexander, "Detection of antibodies to influenza A virus in cattle in association with respiratory disease and reduced milk yield.," *Vet. Rec.*, vol. 143, pp. 637–638., 1998.
- [62] L. W. Lopez and G. T. Wood, "Response of calves to exposure with swine influenza virus.," *Am.J.Vet.Res.*, vol. 148, pp. 1264–1268, 1987.
- [63] D. Kalthoff, B. Hoffmann, T. Harder, M. Durban, and M. Beer, "Experimental infection of cattle with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1).," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, pp. 1132–1134, 2008.
- [64] C. Lin, R. E. Holland, M. H. McCoy, J. Donofrio-Newman, M. L. Vickers, and T.M. Chambers, "Infectivity of equine H3N8 influenza virus in bovine cells and calves.," *Influ. Other Respir. Viruses*, vol. 4, pp. 357–361, 2010.

- [65] B. M. Hause *et al.*, “Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses,” vol. 9, no. 2, 2013.
- [66] G. Yuanji and U. Desselberger, “Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China,” *J. Gen. Virol.*, vol. 65, no. 11, pp. 1857–1872, 1984.
- [67] U. Desselberger, V. R. Racaniello, J. J. Zazra, and P. Palese, “The 3’ and 5’-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity,” *Gene*, vol. 8, no. 3, pp. 315–328, 1980.
- [68] L. Ferguson *et al.*, “Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle,” *J. Virol.*, vol. 90, no. 12, pp. 5636–5642, 2016.
- [69] C. J. Snoeck *et al.*, “Influenza D Virus Circulation in Cattle and Swine, Luxembourg, 2012–2016,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 7, pp. 2012–2013, 2018.
- [70] W. J. S. Wang and C. Peng, “Identification of a potential novel type of influenza virus in Bovine in China,” pp. 493–496, 2014.
- [71] L. Ferguson *et al.*, “Influenza D Virus Infection in Feral Swine Populations , United States,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 6, pp. 1020–1028, 2018.
- [72] H. Mekata, M. Y. S. Hamabe, H. T. T. Omatsu, and T. M. B. M. H. T. Okabayashi, “Molecular epidemiological survey and phylogenetic analysis of bovine influenza D virus in Japan,” *Transbound Emerg. Dis.*, no. June, pp. 355–360, 2017.
- [73] J. Oliva *et al.*, “Serological Evidence of Influenza D Virus Circulation Among Cattle and Small Ruminants in France,” *Viruses*, vol. 516, no. 11, pp. 1–5, 2019.
- [74] J. Six, C. Six, F. Smeets, and E. Le Dréan, “Diagnostic en pathologie virale du veau : intérêt comparé des analyses par ATT ou écouvillon nasal.,” *Recl. des Journées Natl. 2009*, pp. 549–552, 2009.

- [75] C. Rosignoli *et al.*, “Influenza D virus infection in cattle in Italy.,” *Large Anim. Rev.*, vol. 23, no. 4, pp. 123–128, 2017.
- [76] I. H. Brown, S. C. Essen, and S. C. Young, “Significant rising antibody titres to influenza A are associated with an acute reduction in milk yield in cattle.,” *Vet. J.*, vol. 178, pp. 98–1_2, 2008.
- [77] E. Ollin, Z. Sheng, Y. Y. Lang, W. Ma, B. Hause, and F. Li, “Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle,” *J. Virol.*, vol. 89, no. 2, pp. 1036–1042, 2015.
- [78] E. Salem *et al.*, “Pathogenesis, Host Innate Immune Response, and Aerosol Transmission of Influenza D Virus in Cattle,” *J. Virol.*, vol. 93, no. 7, pp. 1853–1918, 2019.
- [79] X. Zhang, C. Outlaw, A. K. Olivier, A. Woolums, W. Epperson, and X. F. Wan, “Pathogenesis of co-infections of influenza D virus and *Mannheimia haemolytica* in cattle,” *Vet. Microbiol.*, vol. 231, no. March, pp. 246–253, 2019.

Annexes

Annexe 1. Classification des virus Influenza selon D. Baltimore (*schéma personnel*)

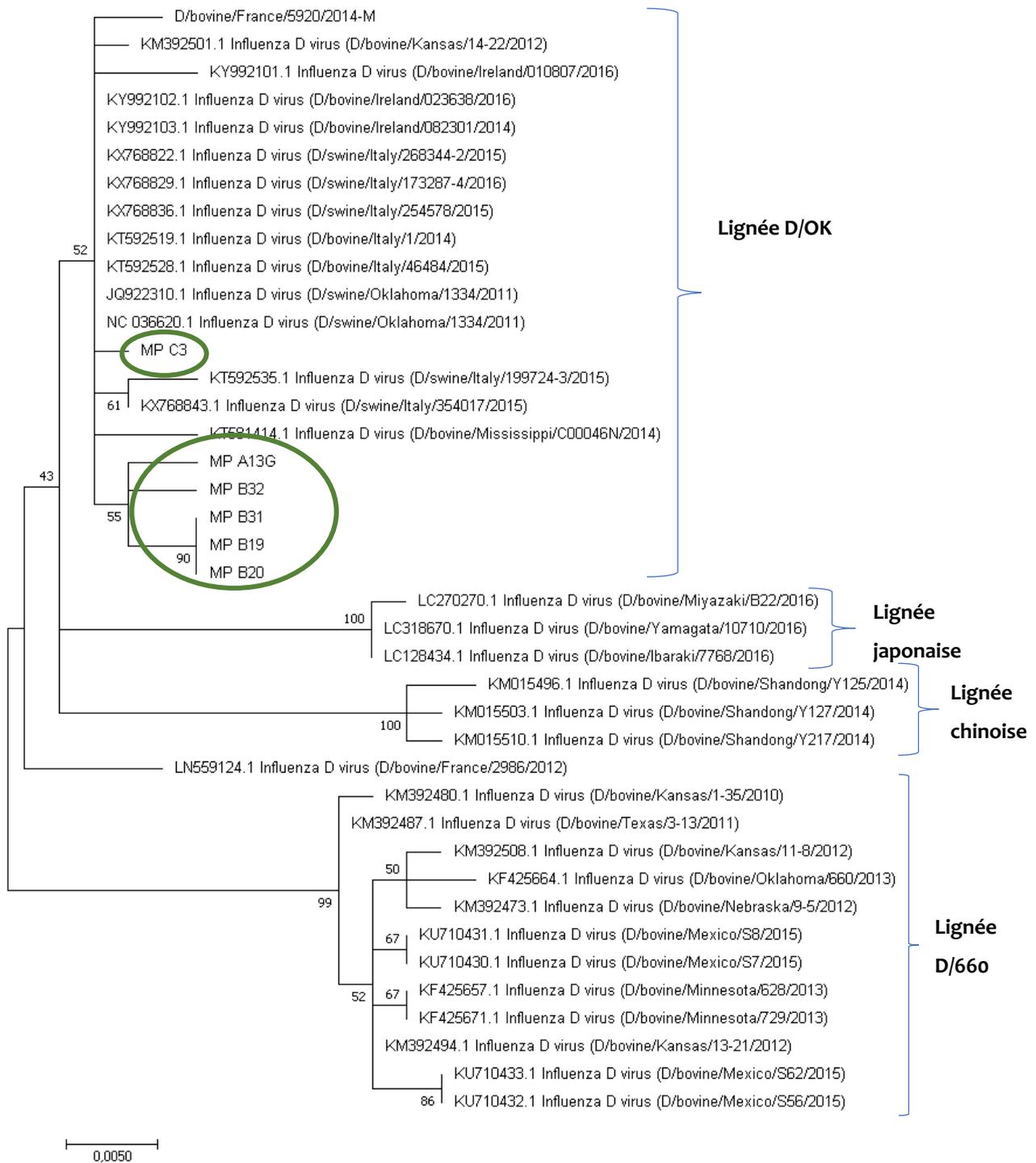


Annexe 2. Liste des élevages visités et caractéristiques

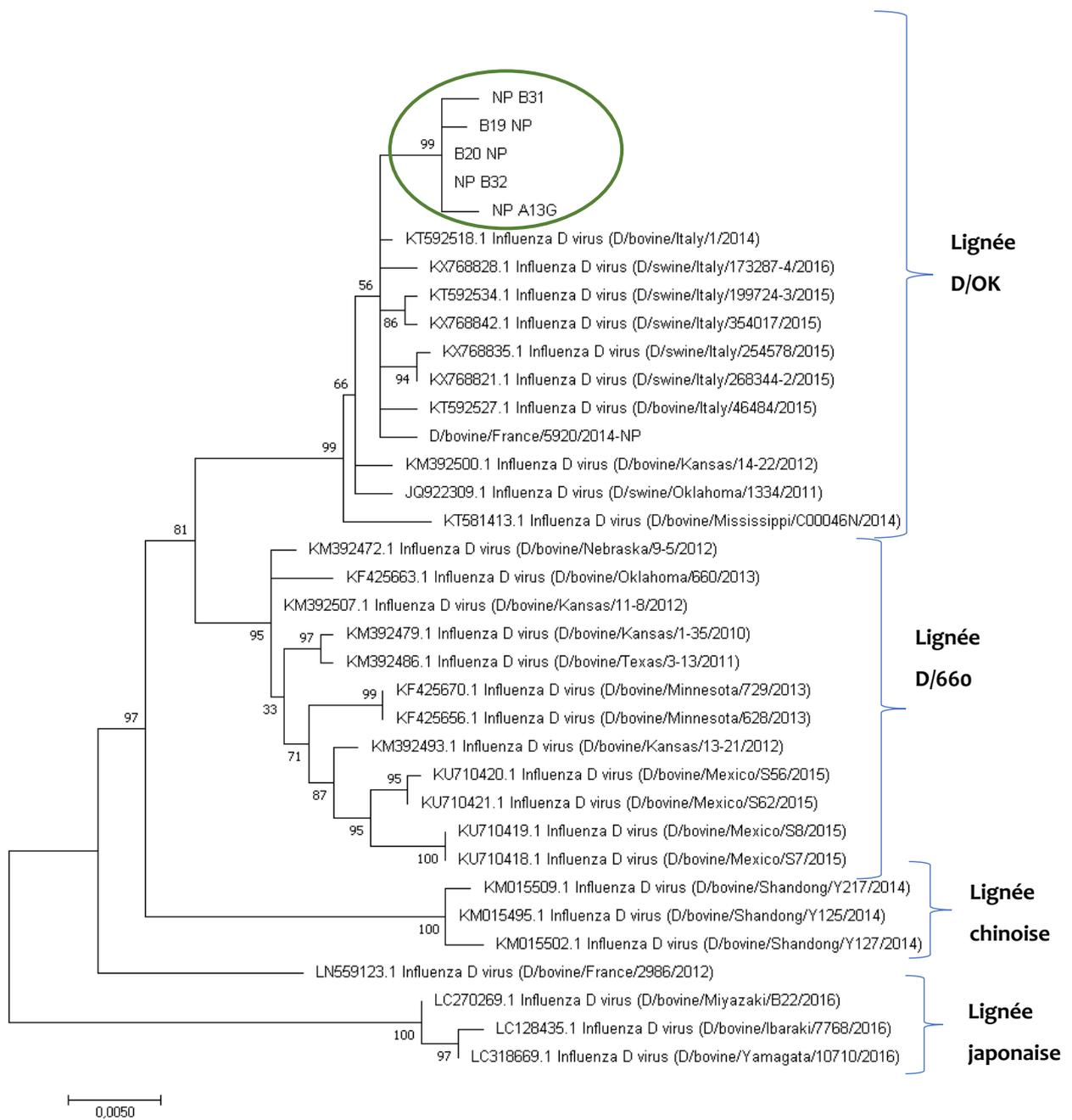
Elevage	Eleveur	Localisation	Date des prélèvements	Opérateurs	Age des veaux	Nombre de veaux
A	Mr Kaberly	Caylus 82160	27/02/2018	Sarah, Gilles, Elias	NR	NR
B	Mme Caudesaygues	Caylus 82161	27/02/2018	Sarah, Gilles, Elias	NR	NR
C	Mr Albinet	Varenes 82370	05/03/2018	Gilles, Elias	NR	NR
D	Mr Trocellier	Saint Alban sur Limagnole 48120	16/10/18 à 8h30	Sarah	5 semaines	150
E	Mr Farges	Chauchailles 48310	16/10/18 à 10h30	Sarah	4 semaines	200
F	Mr Tichit	Espinasse 15110	16/10/18 à 14h	Sarah	1 mois	200
G	Mme Bout	Roffiac 15100	16/10/18 à 18h30	Sarah	1 mois	250
H	Mr Pic	Tannavelle 15100	17/10/18 à 8h	Sarah	58 jours	200
I	Mr Deschambres	Clavières 15320	17/10/18 à 10h30	Sarah	1 mois	160
J	Mr Plagne	Lavastrie 15260	17/10/18 à 14h	Sarah	16 jours	150
K	Mr Pradel	Saint-Flour 15100	17/10/18 à 16h	Sarah	15 jours	97
L	Mr Deschambres	Anglards de Saint-Flour	17/10/18 à 18h30	Sarah	72 jours	203
M	Mr Villeneuve	Lacaune 81230	23/10/18 à 9h	Sarah	14 jours	NR
N	Mr Père	Saint-Saturnin-de-Lennes 12560	23/10/18 à 14h	Sarah	32 jours	NR
O	Mr Calmettes	Sauveterre du Rouergue 12800	23/10/18 à 17h	Sarah	NR	100
P	Mr Albinet	Arthès 81160	24/10/18 à 8h30	Sarah	65 jours	600
Q	Mme ESCALLETTE	Varenes 82370	06/12/18 à 14h	Sarah, Justine	25 jours	200
R	Mr CAZEAUX	Mauvaisin 31190	06/12/18 à 16h	Sarah, Justine	38 jours	150
S	Mme DAUJAN	Montaut	07/12/18 à 9h	Sarah, Justine	45 jours	90

NR : Non renseigné

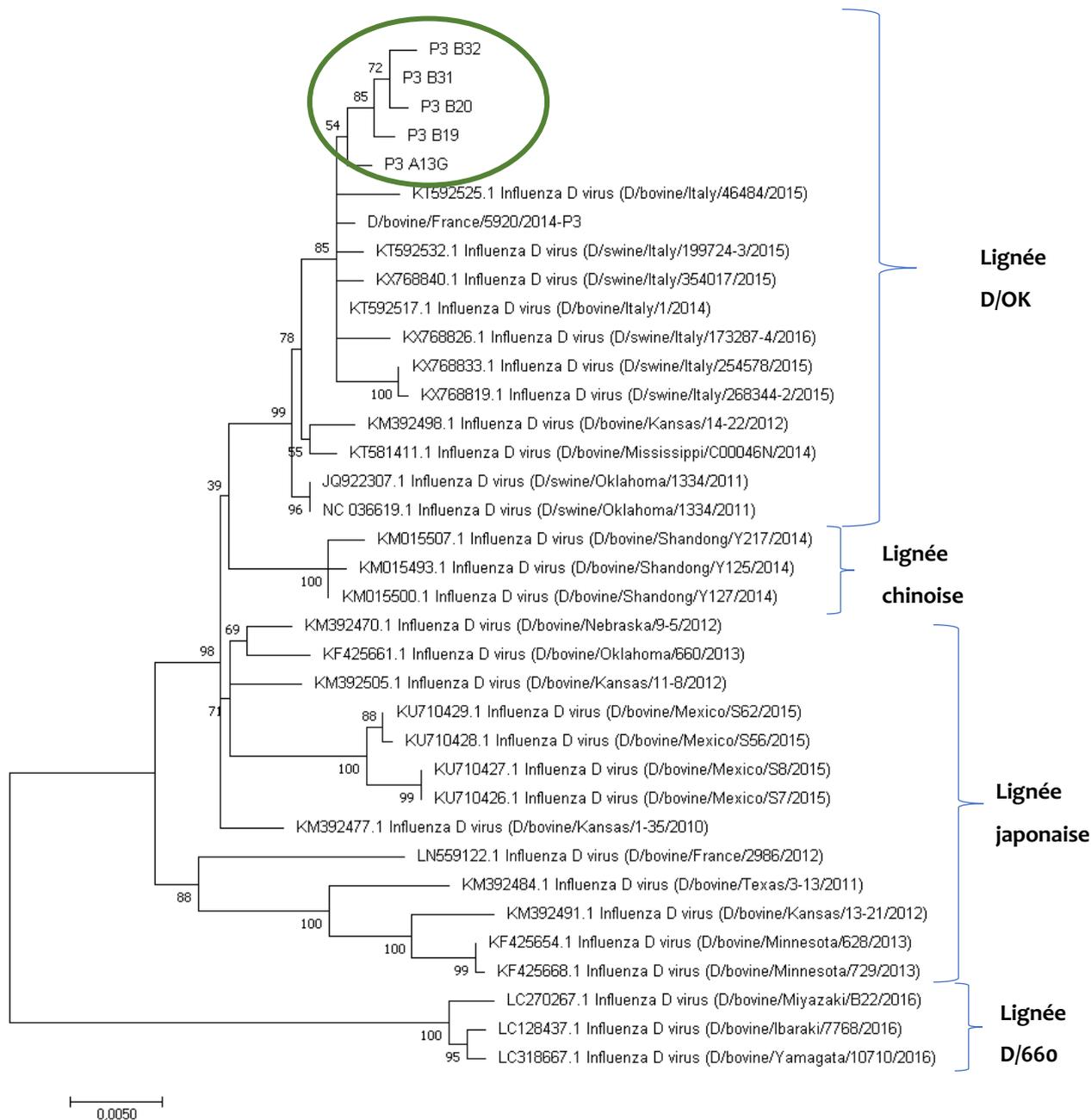
Annexe 3. Arbres phylogénétiques



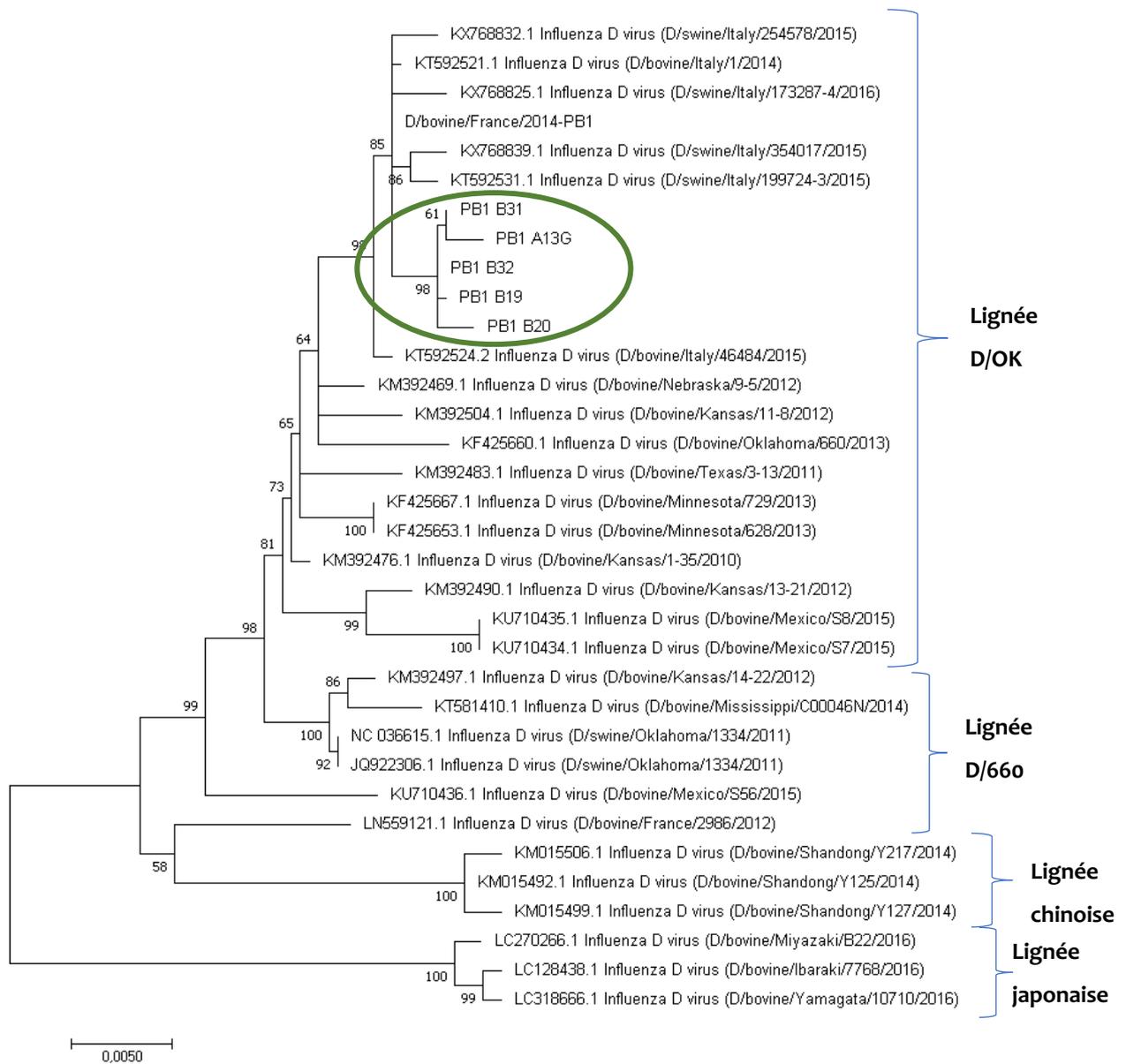
Annexe 3.1. Arbre phylogénétique du segment MP d'IDV



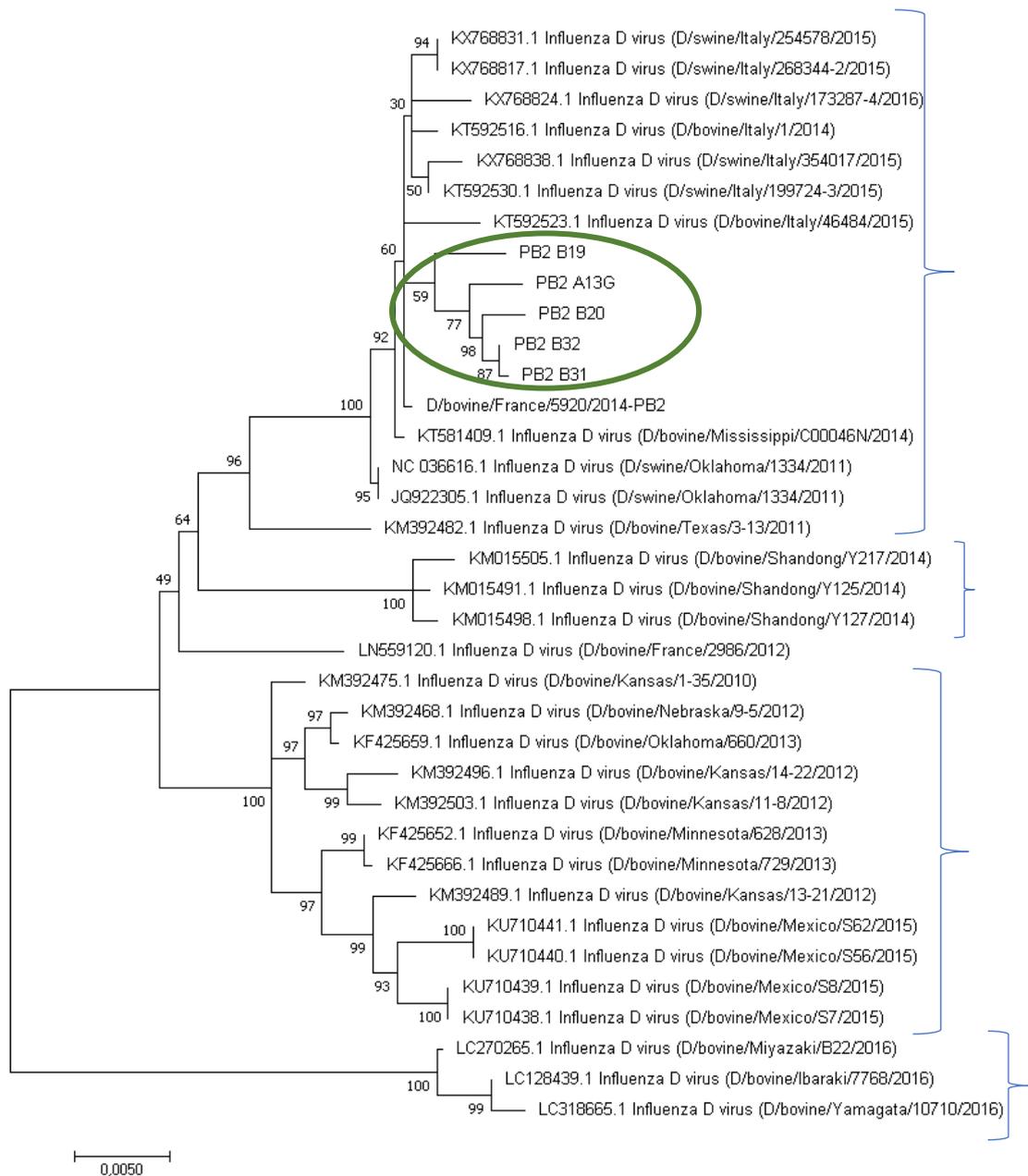
Annexe 3.2. Arbre phylogénétique du segment NP d'IDV



Annexe 3.3. Arbre phylogénétique du segment P3 d'IDV



Annexe 3.4. Arbre phylogénétique du segment PB1 d'IDV



Annexe 3.5. Arbre phylogénétique du segment PB2 d'IDV

Annexe 4. Données de PCR multiplex en 2 parties

Eleavage	n° écht	PCRq IDV Angélique	BCoV	IDV	BRSV	PI3	M. bovis
A	a21	35.35	30,9	34,8	37,1	-	27,4
	a22	36.41	32,1	-	-	-	24,4
	a23	31.46	25,1	28,7	-	-	24,8
	a24	36.04	29,6	35,4	36,1	33,1	27,2
	a25	36.26	33,4	-	-	35,5	26,2
	a26	36.65	29,7	34,7	-	31,9	27,0
	a27	34.76	29,8	34,1	-	33,5	24,1
	a28	35.63	20,3	34,2	35,8	-	21,9
	a29	36.86	27,2	35,5	-	-	22,6
	a30	35.66	12,0	35,7	-	-	21,9
C	c11	34.62	33,7	33,8	-	-	29,8
	c14	35.69	32,0	35,1	-	28,5	29,5
B	b2	35.56	32,3	34,5	32,1	-	29,9
	b5	37.47	33,0	37,7	-	-	29,3
	b6	35.88	32,1	32,5	-	-	31,4
	b8	23.13	31,5	17,5	-	-	32,6
	b9	33.56	32,3	34,2	-	-	30,3
	b10	31.00	33,6	33,7	-	-	28,6
	b11	35.48	17,5	33,8	-	34,4	28,6
	b12	32.76	26,8	32,8			29,8
	b13	16.88	29,2	15,4	-	-	28,1
	b14	28.27	-	30,7	-	-	24,3
	b15	27.00	31,8	28,5	-	-	23,5
	b16	33.07	32,1	33,1	-	-	27,3
	b17	33.69	29,3	33,0	-	-	27,9
	b18	22.85	33,4	22,6	-	-	28,1
	b19	25.32	19,6	24,1	-	-	19,6
	b20	21.89	31,5	18,5	-	-	22,6
	b21	20.20	32,2	17,0	-	-	31,4
	b22	29.88	32,4	28,4	-	-	31,1
	b23	23.64	33,3	27,6	-	-	27,4
	b24	26.25	35,9	29,2	-	-	33,2
b25	31.96	34,1	31,9	-	-	32,6	
b26	30.75	31,0	30,7	-	-	28,3	
b27	28.24	33,8	29,5	-	-	30,5	
b28	30.92	32,8	29,7	-	-	31,1	
b29	31.34	34,1	29,9	-	-	30,6	
b30	31.25	29,9	32,2	-	-	26,2	
b36	28.42	35,8	29,9	-	-	27,8	

b37	17.73	30,6	17,8	-	36,2	29,1
b38	20.99	30,8	19,5	-	35,6	28,1
b39	18.44	30,2	17,9			25,9
b40	30.40	36,1	27,2			28,3
b41	27.80	26,9	24,2	-	32,2	30,5
b42	32.32	23,4	30,6	-	34,8	27,4
b43	29.79	34,8	30,2	-	35,7	25,0
b44	31.36	31,9	28,8	-	-	29,7
b45	29.68	36,8	32,0	-	-	31,5

H. somni	M.haemolytica	P. multocida
-	-	25,8
-	-	26,8
-	-	26,7
-	-	27,3
-	-	28,0
-	-	28,4
-	-	25,5
-	-	22,5
-	-	30,7
-	-	25,5
-	-	28,0
-	-	28,3
-	-	26,2
-	-	26,8
-	-	31,2
-	-	27,7
-	-	28,9
-	-	25,0
-	-	26,8
-	-	31,0
-	-	25,4
-	-	33,2
-	-	25,4
-	-	32,9
-	-	30,8
-	-	33,2
-	-	30,1
-	36,5	27,5
-	-	27,0
-	-	23,5
-	-	31,8
-	-	32,5
-	-	31,9
-	34,0	32,6
-	-	30,0
-	-	32,0
-	-	31,1

-	-	33,9
-	-	26,5
-	-	23,2
-	-	20,8
-	-	24,0
29,5	-	27,4
-	-	24,8
-	-	24,2
-	-	29,6
-	-	27,3
-	-	25,9

AGREMENT SCIENTIFIQUE

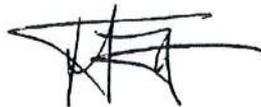
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Gilles MEYER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Sarah-Laure GRENON intitulée « Isolement et caractérisation moléculaire de l'influenza virus D chez les veaux de boucherie » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 04/10/2019
Professeur Gilles MEYER
Enseignant-chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jacques IZOPET



Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Frédéric BOUSQUET

En déléguation,

Caroline LACROUX
Directrice de l'enseignement
et de la vie étudiante

Vu et autorisation de l'impression :
Présidente de l'Université Paul Sabatier
Madame Régine ANDRE-OBRECHT

La Présidente de l'Université Paul Sabatier,
par délégation,
Le Vice-Président de la GFVU
Richard GUILLET

Mme Sarah-Laure GRENON
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le : 24/09/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

TITRE : Isolement et caractérisation moléculaire du virus influenza D chez les veaux de boucherie en France.

RESUME : Le virus influenza D (IDV) a été identifié en France en 2014 et est probablement impliqué dans les bronchopneumonies infectieuses (BPI) des jeunes bovins. Cette étude avait pour objectif la caractérisation moléculaire d'IDV en élevages de veaux de boucherie. A partir de 1890 prélèvements par écouvillonnage nasal, dont 383 testés par PCR, nous avons montré qu'IDV était fortement présent avec des différences de prévalence entre élevages selon le contexte épidémiologique. Le séquençage de 7 isolats a montré qu'ils appartiennent tous au sous-groupe génétique D / OK, qui est le seul qui circule actuellement à grande échelle en Europe. La distance génétique d'IDV entre élevages varie entre 0,2% et 1,4% selon les gènes, suggérant une très forte parenté entre les isolats récupérés en Région Occitanie et Rhône-Alpes-Auvergne. Finalement IDV est très fréquemment détecté en associant avec le coronavirus bovin et *Mycoplasma bovis* dans ces élevages, soulignant le rôle des co-infections.

MOTS CLES : influenza D, prévalence, veau, respiratoire, séquences, genome

TITLE : Molecular characterization of influenza virus D in veal calves in France.

SUMMARY : Influenza D virus (IDV) was recently identified in France in 2014 and is probably involved in bovine respiratory disease (BRD) in young cattle. This study aimed at the molecular characterization of IDV in beef veal farms. From 1890 nasal swab samples with 383 of them tested by PCR, we showed that IDV was strongly present but with differences in prevalence between farms according to the epidemiological context. Sequencing of 7 isolates showed that they all belong to the D / OK genetic subgroup, which is the only one currently circulating widely in Europe. The genetic distance of IDV between farms varies between 0.2% and 1.4% depending on the genes, suggesting a very strong relationship between the isolates recovered in the Occitanie and Rhône-Alpes-Auvergne regions. Finally, IDV is very frequently detected in these farms in association with the bovine coronavirus and *Mycoplasma bovis*, highlighting the role of co-infections.

KEY WORDS: influenza D, prevalence, cattle, virus, BRD, genome, sequence