

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES

N° d'ordre
Série

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT D'ETAT EN SCIENCES VETERINAIRES

**Option
MICROBIOLOGIE**

Par

Bakir MAMACHE

SUJET

**ETUDE DES PATHOLOGIES DIGESTIVE ET RESPIRATOIRE DES
VEAUX DANS LA REGION DE BATNA :
ETUDE COMPARATIVE DE DEUX GROUPES D'AGE**

Soutenu le

Devant le jury composé de :

Président : R.OUZROUT ,Professeur, Faculté des Sciences El- Tarf

Examineurs :

A. BENMAKHOUF , Maître de conférences , Faculté des Sciences Constantine

M. TLIDJANE , Professeur, Faculté des Sciences Batna.

T. MEZIANE ,Maître de conférences , Faculté des Sciences Batna

Directeur de thèse : F.SMATI , Professeur , Faculté de Médecine Constantine.

DEDICACES

A la mémoire de mon père, qui nous a quittés durant la finalisation de cette thèse, en signe de reconnaissance et de gratitude. Que dieu ait son âme et l'accueille dans son vaste paradis.

A ma mère

Pour toutes les souffrances qu'elle a endurées pour nous donner une éducation et nous projeter un bel avenir.

A ma femme

Pour son soutien moral durant toute la durée de la rédaction de cette thèse.

A mes enfants :

Rania, Ismahane, Imene et Farah

A mon chouchou Idris Mohammed Lamine

A mes frères et sœurs

A tous mes neveux et nièces.

Aux membres du jury

A monsieur, le Professeur Ouzrout Rachid.

Pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Madame, le Professeur Smati Farida,

Directrice de thèse pour ses conseils et encouragements

A Messieurs les membres du jury :

Docteur A. Benmakhlouf ; Maître de conférences, U. de Constantine

Docteur T Meziane ; Maître de conférences, U. de Batna

Docteur M. Tlidjane ; Professeur, U. de Batna

A mon ami et camarade de toujours Docteur Meziane Toufik ,
pour l'aide précieuse et pour la frappe exemplaire de ce travail

A mes amis et confrères

Belkhiri Mabrouk

Kassah Laouar Ahmed

Tlidjane Madjid

Safsaf Boubakeur

Melizi Mohammed

A mes étudiants de magister

Belbedj Hamid

Titaouine Mohammed

Laabassi Farouk

Adili Nezar

INTRODUCTION

Durant les deux dernières décennies, le nombre d'animaux dans les fermes a augmenté considérablement pour des raisons économiques. Par conséquent, on a noté une augmentation concomitante des pathologies digestive et respiratoire surtout chez les veaux. Des moyens considérables ont été déployés pour l'étude de ces entités pathologiques surtout en Europe et en Amérique du Nord. Une part importante de ces ressources a été utilisée pour l'identification des micro-organismes qui seraient responsables des pathologies respiratoire et digestive chez les veaux. Donc, beaucoup d'informations sont actuellement disponibles dans la littérature et renferment d'excellentes revues bibliographiques (Yates, 1982).

Les pathologies digestive et respiratoire représentent un très large sujet et comprennent une multitude d'entités cliniques (Lillie, 1974). Il est donc hors de question pour cette revue bibliographique de détailler tous les aspects du complexe pathologique des infections respiratoires et digestives du veau. Néanmoins, une approche simplifiée des mécanismes pathogéniques de ces deux grandes pathologies nous est parue nécessaire à donner afin d'élucider l'influence de certains microorganismes dans l'apparition et le développement des maladies respiratoires et digestives des veaux de même que l'influence des facteurs de l'environnement et surtout de l'âge dans la sévérité des signes cliniques observés. Dans ce but, la partie bibliographique est divisée en deux chapitres traitant chacun une pathologie.

Les maladies infectieuses digestives et respiratoires sont devenues la cause majeure des pertes économiques des veaux de boucherie ou de race laitière. Pour cette raison, elles sont devenues un sujet d'intérêt pour les vétérinaires chercheurs et praticiens dans le monde.

Les pertes économiques considérables associées à ces infections sont dues au fait, qu'elles affectent tous les types d'élevage bovin, des veaux d'âges et de races différents et qu'elles présentent une faible réponse aux mesures préventives et thérapeutiques (Mc Kercher, 1978 ; Orr, 1992 ; Barrett,1998).

Des épizooties de maladies respiratoires sont devenues plus fréquentes au cours des dernières décennies à cause de l'introduction de méthodes intensives d'élevage de veaux à l'engrais (Zerai, Mamache et Rowan, 1990 ; Nakaya, Tomita, Ikenchi et Torikai,1998 ; Sayed et Ali, 2001).

Actuellement, un grand nombre de bovins, d'âges, de races et de statuts microbiologiques divers sont souvent rassemblés dans des fermes soit pour l'engraissement , soit pour la production de génisses pour le remplacement. Ces rassemblements jouent un rôle capital dans l'épidémiologie des maladies digestives et respiratoires.

Ces maladies provoquent de lourdes pertes économiques aux producteurs à cause de la réduction de gains de poids, et de la capacité de conversion des aliments, du retard dans la vente des animaux et le coût élevé des programmes préventifs et thérapeutiques. Les bouchers et les industriels de la viande paient également un lourd tribut à cause de la saisie des abats et des carcasses du circuit commercial en vue de préserver la santé publique (Jensen et Mackey, 1979 ; Slocombe, Derksen et Robinson, 1984 ; Salah et El-Baby, 1998).

La microflore de l'appareil respiratoire est un mélange complexe de microorganismes. Elle comprend des bactéries (par exemple, Pasteurella spp., Corynebacterium pyogènes, Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Neisseria spp. etc...), des virus (par exemple, le virus parainfluenza type-3 (PI-3), les réovirus, les adénovirus, les rhinovirus, le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) et l'herpesvirus bovin type-1 (HVB-1), des mycoplasmes et des chlamydies (Lillie, 1974 ; Yates, 1982 ; Barrett, 1998 ; Stotz, Purdy, Lin, Burrell, Truax, Briggs, Frank et Loan, 2000).

Certains microorganismes sont considérés comme agents étiologiques authentiques des maladies respiratoires car ils sont capables de provoquer ces maladies en l'absence de facteurs déclenchants ou prédisposants. Parmi ces microorganismes, on cite des bactéries telle que Pasteurella haemolytica, des virus tel que le HVB-1 et des mycoplasmes tel que Mycoplasma mycoides var.mycoides. D'autres microorganismes exigent l'intervention de facteurs prédisposants pour exprimer leur pouvoir pathogène.

Plusieurs études expérimentales ont été réalisées pour comprendre l'étiologie complexe des maladies respiratoires bovines. Pour cette raison, des bovins de races, d'âges et de statuts microbiologiques différents ont été exposés par diverses méthodes à des virus, des bactéries et des associations virales et bactériennes et à des mycoplasmes seuls ou en associations avec des virus ou des bactéries (Yates, 1982 ; Nakaya et al, 1998, Stortz et al, 2000).

Quoique les microorganismes soient les responsables directs de l'induction du dommage du tractus respiratoire des bovins, plusieurs autres facteurs sont incriminés dans l'augmentation de l'incidence et de la sévérité des infections respiratoires. Ces facteurs sont les températures extrêmes, l'humidité relative, le transport sur de longues distances avec l'anxiété et la fatigue conséquentes, les irrégularités dans l'alimentation et l'abreuvement, les changements brusques de la ration alimentaire, l'écornage, les bains antiparasitaires, la castration et la vaccination (Jensen et Mackey, 1979 ; Zerai et al, 1990 ; Sayed et Ali, 2001).

La pathologie digestive des veaux est dominée par la diarrhée néonatale. Cette entité clinique entraîne des pertes économiques considérables durant la période du jeune âge dans la plupart des pays (Radostits, Gay, Blood et Hinchcliff, 2001).

Leurs causes sont très variées. Une simple modification alimentaire, un stress (allotement) peuvent provoquer l'apparition de la diarrhée. Parallèlement, des virus, des bactéries ou des parasites peuvent en être responsables. Les microorganismes responsables des diarrhées infectieuses sont les E. coli entéropathogènes (ECEP), les E. coli entérotoxigènes (ECET), le rotavirus, le coronavirus et les cryptosporidies.

Ce travail a été réalisé dans le but de faire une étude comparative détaillée des microflore digestive et respiratoire. Il a porté essentiellement sur les variations quantitative et qualitative de la colonisation des voies respiratoires supérieures des veaux, la mise en évidence du virus parainfluenza type-3. L'accent a, également, été mis sur l'isolement et la caractérisation des colibacilles K-99⁺. La mise en évidence du rotavirus dans les fèces a été réalisée en comparant deux méthodes de détection directe de l'antigène viral dans les fèces qui sont l'agglutination au latex (Pastorex_{ND}) et l'ELISA utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques du sérotype G-6 du rotavirus.

MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre, les matériels et méthodes communs à tous les prélèvements nasaux et fécaux sont décrits.

1-Matériels généraux :

1.1. Verrerie :

Toute la verrerie contaminée, à l'exception des pipettes, a été collectée dans des corbeilles inoxydables et autoclavées à 121°C pendant 15 minutes. Les petites bouteilles à bouchons qui ont été utilisées pour le prélèvement des échantillons nasaux et fécaux ont été vidées de leurs contenus stériles, brossées avec des brosses et une solution désinfectante d'eau de Javel à 12°, à 50% (v/v) dans l'eau puis rincées dans l'eau de robinet et ensuite plongées dans l'eau distillée bouillante pendant 30 minutes. Après ébullition, la verrerie a été rincée dans l'eau de robinet, l'eau désionisée et l'eau distillée successivement. Après un autre rinçage dans l'eau désionisée, la verrerie est séchée dans un séchoir à 70°-80°C. Les béchers et les autres récipients de mesures ont été coiffés avec du papier aluminium et stérilisés dans un four à 160°C pendant 2 heures au minimum. La verrerie neuve a été traitée de façon similaire sans procédures de stérilisation initiale.

1.2. Pipettes :

Après utilisation, les pipettes graduées sont placées dans des récipients spécifiques en plastique spécial et contenant une solution désinfectante et laissées pendant une nuit. Les bouchons de coton sont enlevés et les pipettes graduées sont plongées dans une solution d'eau de Javel à 12° et 50% (v/v) dans l'eau pendant 4 heures, lavées à l'eau de robinet puis dans l'eau distillée pendant une heure au moins. Elles sont séchées dans un four à 70°-80°C, bouchées à l'aide de bouts de coton puis soit emballées dans du papier kraft ou placées dans des cylindres métalliques puis stérilisées dans un four à 160°C pendant deux heures. Les pipettes graduées et les pipettes Pasteur neuves sont préparées comme précédemment décrit, mais elles ne sont pas traitées dans la solution désinfectante. Les pipettes Pasteur sont jetées après usage unique.

2- Milieux de culture :

2.1-Milieux de culture pour bactériologie :

L'isolement et l'identification des bactéries ont été réalisés en utilisant les milieux de culture conventionnels ou les systèmes « Analytical Profil Index » (API)

Les détails sur la préparation des milieux de culture conventionnels sont donnés en annexes.

3. Les animaux :

Les veaux appartiennent à la ferme Messaoudi Laid (COOPSEL) dans la Daïra d'El-Madher, wilaya de Batna. Les veaux ont été divisés en deux groupes de six veaux mâles de race Frisonne-Holstein.

Le lot 1 est composé de veaux dont la moyenne d'âge est d'environ 1 mois avec des extrêmes allant de 03 jours à 48 jours.

Le lot 2 est composé de veaux dont la moyenne d'âge est d'environ 6 mois avec des extrêmes allant de 4 à 7,5 mois.

3.1. Alimentation :

Durant la période d'étude, les veaux jeunes ($X_{\text{âge}} = 1$ mois) ont été placés en un seul groupe dans un enclos séparé avec des règles d'élevage et d'hygiène non satisfaisantes (conception du bâtiment, réglage de la température, espace, circulation de l'air, ventilation et humidité relative). Ces jeunes veaux sont nourris de lait de leurs mères avec deux tétées par jour avant la traite.

Pour les veaux âgés ($X_{\text{âge}} = 6$ mois), durant le jour ils sont conduits sur un pâturage ; à leur entrée à la ferme, ils reçoivent une ration à base de concentrés et de foin de bonne qualité. L'abreuvement s'effectue deux fois par jour à partir d'un abreuvoir commun à tous les animaux de l'élevage.

3.2. Prélèvements et méthodes de prélèvement :

Les échantillons ont été prélevés de chaque veau et consistaient en des écouvillons nasaux et fécaux. Ces prélèvements sont effectués à intervalles réguliers d'une semaine pendant 8 semaines.

3.2.1. Ecouvillons nasaux :

Les écouvillons nasaux ont été utilisés pour prélever du mucus de la cavité nasale de chaque veau. L'écouvillon est inséré à une distance fixe de 10 cm pour atteindre les meatus ventral. L'écouvillon est tourné 10 fois avant son retrait puis il est énergiquement pressé et roulé contre la paroi d'un petit flacon à bouchon et contenant 3 ml d'un milieu de transport sans antibiotique. Le même milieu de transport a été utilisé pour les écouvillons fécaux.

3.2.2. Ecouvillons fécaux et matières fécales :

Les mêmes écouvillons que ceux utilisés pour le prélèvement du mucus nasal ont été utilisés.

L'écouvillon est introduit à une distance fixe de 10 cm dans le rectum, puis tourné 10 fois avant son retrait puis il est pressé et roulé contre la paroi d'un petit flacon à bouchon contenant 3 ml de milieu de transport sans antibiotique.

Les matières fécales ont été récoltées dans des pots en plastique stériles avec bouchons. L'opérateur effectue un massage de l'ampoule rectale et le réflexe de défécation est déclenché. Il récolte une quantité de 5-10 grammes de matière fécale dans le pot. Pour tous les prélèvements, une procédure de numérotation a été adoptée et maintenue durant toute la période d'étude. Le numéro du veau, son groupe, le nombre et l'origine du prélèvement ont été utilisés pour marquer les flacons servant au prélèvement.

Exemple de marquage de routine utilisé

1 J 1 N

1 : N° du veau

J : Groupe jeune

1 : N° du prélèvement

N : écouvillon nasal

2 A 1 F

2 : N° du veau

A : Groupe âgé

1 : N° du prélèvement

F : écouvillon fécal

3.2.3. Le prélèvement sanguin :

le prélèvement sanguin est réalisé par ponction de la veine jugulaire. Le sang est récolté dans un tube sec type Vacutainer sans anticoagulant. Le tube est laissé pendant une nuit à température ambiante. Le sérum est récolté dans des aliquots de 3ml qui seront congelés à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

Remarque : tous les prélèvements sont transportés sous froid (glacière isotherme) au laboratoire pour être traités immédiatement ou congelés jusqu'à leur utilisation. Les écouvillons nasaux, fécaux et les sérums sont congelés à - 20°C jusqu'à leur acheminement au laboratoire de pathologie vétérinaire de l'université de Liverpool. Le transport est réalisé en utilisant la neige carbonique fournie par l'ENGI de Constantine.

4. Isolement, quantification et identification des micro-organismes :

4.1. Séparation des prélèvements :

Au laboratoire, les échantillons, sont divisés en deux parties de 1,5 ml chacune. Une portion est immédiatement utilisée pour la bactériologie. La deuxième partie est stockée à -

70°C pour une étude virologique éventuelle. Les matières fécales sont également congelées pour l'étude du Rotavirus.

4.2. Bactériologie :

Les prélèvements pour la bactériologie ont été agités énergiquement à l'aide d'un vortex et des séries de dilution au 1/10 ont été réalisées à l'aide du PBS à pH 7,2. Les dilutions sont effectuées à l'aide des pipettes Eppendorf munies d'embouts plastique stériles qui sont jetés après chaque utilisation.

*** Ecouvillons nasaux :**

Des boîtes de Pétri contenant de la gélose au sang sont inoculées à l'aide de Pipettes Eppendorf munies d'embouts plastiques en commençant de la plus haute dilution sans changer d'embouts plastiques. La pipette est ajustée pour délivrer 20 µl d'inoculum. L'inoculum est réparti sur toute la boîte de Pétri à l'aide d'un bâton de verre stérile. Les boîtes sont laissées à la température du laboratoire pendant 15 minutes environ pour permettre l'absorption de l'inoculum puis mises en incubation en aérobiose à 37°C pendant 24 heures.

Les colonies bactériennes sont groupées selon leur apparence morphologique et allouées des numéros d'identification provisoires puis comptées selon la méthode de Miles, Misra et Irwin (1938).

Les comptes sont transformés par la suite en unités bactériennes formant des colonies (UBFC) par écouvillon.

Une colonie représentative de chaque groupe bactérien de même apparence morphologique est repiquée sur une boîte de Pétri contenant de la gélose au sang pour une caractérisation et identification approfondie selon les méthodes conventionnelles. Les bactéries à Gram négatif ont été identifiées à l'aide des systèmes API (API-20NE) selon les instructions du fabricant.

*** Ecouvillons fécaux :**

Les souches de colibacilles sont isolées par dissémination d'une goutte (50 µl) de matières fécales sur le milieu Minca gélosé proposé par Guinée, Wedkamp et Jansen. (1977), additionné de mélange POLYVITEX commercialisé par Bio-Mérieux. Ce milieu est coulé en boîte de Pétri et après ensemencement est mis à incuber pendant 24 heures à 37°C.

4.2.1. Identification des souches

4.2.1.1. Identification biochimique :

Les colonies suspectes sont repiquées sur une galerie d'identification biochimique rapide contenant le milieu de KLIGLER-HAJNA, citrate de Simmons et urée-indole. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, ces trois milieux permettent d'effectuer une identification rapide sur la base des caractères biochimiques, à savoir la fermentation avec ou sans gaz du glucose et du lactose, la production d'H₂S, d'indole et d'uréase.

4.2.1.2 Identification sérologique :

L'analyse antigénique des souches d'E.coli est réalisée par agglutination rapide sur lame d'une culture sur milieu gélosé prélevé avec une anse de platine et mise en suspension dans une goutte d'un sérum immuno-spécifique.

Une réaction de séro-agglutination K₉₉ positive se traduit rapidement en présence d'antisérum anti- K₉₉ par la formation d'agglutinats avec éclaircissement de la suspension bactérienne.

Les souches d'E.coli K₉₉ au cours du premier passage vont subir un deuxième passage sur milieu Minca-polyvitex. incliné en tubes et une séro-agglutination rapide sur lame pour augmenter les chances d'expression de l'antigène K₉₉.

5. Analyse des résultats :

Les UBFC totales dans les écouvillons nasaux ont été comparées entre groupes de veaux et à l'intérieur d'un même groupe en utilisant le test t-de Student (Paires et impaires).

Le pourcentage de la composition des UBFC totales pour une espèce bactérienne donnée (exemple P.haemolytica) a été obtenu en divisant le compte total des UBFC de cette espèce bactérienne par le compte total des UBFC et en multipliant le résultat par 100.

$$\text{Exemple : \% composition de } \underline{P.haemolytica (P.h)} = \frac{\text{UBFC DE P.h}}{\text{UBFC totales}} \times 100$$

Le test χ_2 est utilisé pour l'analyse des différences dans les fréquences d'isolement des espèces bactériennes entre les deux groupes de veaux et à l'intérieur du même groupe.

6- ROTAVIRUS : méthodes de diagnostic

6.1- Le PASTOREX^{N.D.}. (Diagnostics Pasteur) (réalisé en Grande Bretagne).

Principe : Des particules de latex sensibilisées avec la fraction immuno-globulinique (IgG) d'un antisérum de lapin anti-rotavirus, sont agglutinées en présence de rotavirus présents dans les selles. Des particules de latex sensibilisées avec la fraction immuno-globulinique (IgG) d'un antisérum de lapin normal sert de latex de contrôle négatif.

Réactifs :

- R1 : Tampon diluant +0,015 M Na N₃
- R2 : Latex anti-rotavirus +0,015 M Na N₃
- R3 : Latex de contrôle négatif +0,015 M Na N₃
- R4 : Antigène de contrôle positif +0,015 M Na N₃

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Leur conservation se fait à une température comprise entre 2 et 8°C

- Lame d'agglutination 6 puits.
- Agitateurs à usage unique.

Matériel nécessaire non fourni :

Pipettes type « Pasteur », pipettes de 50 µl., tubes à hémolyse, centrifugeuse , agitateur type « Vortex », filtres Ø = 0,80 µ.

Mode opératoire :

1) Récolte et préparation des échantillons

- Recueilli les selles dans des flacons stériles.
- Diluer un échantillon de selles au 1/10 dans le tampon de dilution-R1 (0,25 gr de selles dans 2,5 ml de R1).
- Agiter au Vortex pendant 1 min.
- Centrifuger à 1000 tours/min cette suspension .

La réaction d'agglutination s'effectue sur le surnageant.

Note : Dans le cas de selles très muqueuses , il est difficile malgré la centrifugation , d'obtenir un surnageant clair. Dans ce cas, il est conseillé de filtrer la partie muqueuse de ce surnageant sur un filtre de diamètre égal à 0,80 µ .

2) Réaction d'agglutination

- Bien homogénéiser les deux flacons de latex R2 et R3 (Vortex par exemple).
- Déposer une goutte de R2 et un goutte de R3 sur deux puits distincts de la lame.
- Ajouter 50 µl du surnageant dans chaque puits.
- Mélanger avec un agitateur à usage unique.
- Observer l'agglutination après 2 mn de rotation de la lame.

3) Lecture et interprétation

| | | |
|----------|-------------------------|---------------------------|
| REACTION | Puits test surnageant + | Puits contrôle surnageant |
|----------|-------------------------|---------------------------|

| | R2 | + R3 |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
| Réaction positive | Agglutination | Suspension homogène |
| Réaction équivoque Test à répéter | Agglutination | Agglutination |
| Réaction négative | Suspension homogène | Suspension homogène |

6.2 :Le PATHFINDER (Kallestad Diagnostics. 1120 Capital of Texas, South Austin TX 78746).

Détection directe d'antigène

Le système PATHFINDER^R de détection directe d'antigène pour rotavirus est un test immunoenzymatique (ELISA) pour la détection directe du rotavirus dans les fèces.

Principe de la méthode

Les virus présents dans le prélèvement de fèces se lient à des anticorps polyclonaux anti-rotavirus fixés sur un tube en plastique. Un anticorps monoclonal anti-rotavirus , conjugué à la peroxydase est ajouté et se lie à l'antigène viral capté sur le fond du tube. L'anticorps monoclonal est spécifique d'un antigène rotavirus commun, déterminé par le sixième gène viral (G6) . Après une étape de lavage pour éliminer l'échantillon et le conjugué non fixé, on ajoute un substrat de la peroxydase qui donne une coloration bleue proportionnelle à la quantité de virus présents dans le prélèvement. La comparaison visuelle ou spectrophotométrique de la couleur du contrôle et des échantillons à tester détermine la présence ou l'absence de rotavirus . La présence d'une couleur bleue plus intense que celle du contrôle négatif indique la présence d'antigène de rotavirus dans le prélèvement de l'animal malade.

Réactifs

- Garder tous les réactifs à 2-8°C
- Eviter de congeler les réactifs .
- Laisser revenir tous les réactifs à température ambiante (23±3°C) avant utilisation
- Remettre les réactifs rapidement à 2-8°C après usage.

6.2.1- Tubes anticorps

Le coffret anticorps contient 50 tubes en polystyrène sensibilisés par des IgG de lapin anti-rotavirus. Conserver les tubes dans les sachets fermés . Ne pas ouvrir les sachets avant qu'ils ne soient revenus à température ambiante .A ce moment , sortir les tubes nécessaires pour la recherche et bien refermer le sachet pour conserver les tubes non utilisés.

6.2.2- Anticorps monoclonal anti-rotavirus marqué à la peroxydase .

Flacon de 5ml d'anticorps monoclonal de souris conjugué à la peroxydase avec un stabilisateur de protéine , du merthiolate et un tampon salin.

6.2.3-Diluant pour échantillon

Flacon de 25ml de tampon salin avec EDTA , merthiolate et surfactant.

6.2.4-Contrôle positif

Flacon de 3ml de rotavirus simien atténué (SA-11) en tampon salin avec EDTA , surfactant, merthiolate et stabilisateur de protéine

6.2.5-tampon substrat

Flacon de 40ml de tampon citrate et peroxyde d'hydrogène.

6.2.6-Chromogène

Flacon de 25ml de tétramethylbenzidine dissout en HCL

Méthodologie

*** Matériel nécessaire mais non fourni**

- 1-Eau distillée ou désionisée de bonne qualité pour diluer l'acide et laver les tubes.
- 2- Acide sulfurique 1N , pour arrêter la réaction avant la lecture photométrique .
Pour préparer 500ml de H₂SO₄ 1N , ajouter 14ml d'acide concentré à 486ml d'eau distillée.
- 3- Bâtonnets applicateurs pour échantillons de fèces
- 4- Portoirs pour tubes à hémolyse
- 5- Pipettes à embouts jetables de 30µl, 100µl et 300µl
- 6-Pipettes de 10ml.
- 7-Tubes à hémolyse en verre 12x 75mm
- 8-Parafilm
- 9-Vortex

Procédure

- Laisser revenir tous les réactifs et échantillons à température ambiante.
- Pendant l'adjonction des réactifs , éviter les délais ou les interruptions .Ne pas laisser sécher les tubes au cours de la manipulation

ATTENTION : ne pas pipeter avec la bouche , ne pas pipeter contre la paroi du tube.

- Changer d'embout entre chaque dilution
- 1- Identifier un tube anticorps pour le contrôle négatif et un pour le contrôle positif .
Identifier un tube pour chaque échantillon.

REMARQUE

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être intégrés dans chaque série.

2- Ajouter 100 µl d'anticorps monoclonal marqué à la peroxydase dans chaque tube.

3- Ajouter 300 µl de diluant pour échantillon dans le tube contrôle négatif et 300 µl de contrôle positif dans le tube correspondant.

4- Ajouter les échantillons à tester dans les tubes appropriés selon les modalités suivantes :

- Selles fraîches

Si les prélèvements sont des selles fraîches, mettre 300 µl de diluant par échantillon dans les tubes appropriés . Pipeter 30 µl de selles fraîches dans les tubes. Si la selle ne peut être pipetée, transférer une petite quantité (équivalente à 30 µl) avec un bâtonnet applicateur, dans les 300 µl de diluant.

- Suspensions

Si le prélèvement a été mis au préalable en suspension, transférer 100 à 300 µl d'échantillon dans le tube approprié, ajouter du diluant pour échantillon pour compléter le volume à 300 µl.

5- Agiter doucement les tubes et incuber à température ambiante 60 ±10 mn .

6- Laver tous les tubes 5 – 7 fois avec 2 à 4 ml d'eau distillée.

7- Préparer la solution de travail de coloration.

Attention : Eviter tout contact du chromogène ou de la solution de travail avec un métal ou un agent oxydant.

a) Dans un tube en verre propre, mettre les quantités nécessaire de tampon substrat et de chromogène :

- * Tampon substrat : 0,5 ml par tube.

- * Chromogène : une goutte par ml de tampon substrat.

b) Couvrir le tube d'un para film et mélanger par retournements.

Attention : Eviter au maximum l'exposition à la lumière. Utiliser la solution de travail dans les 30 min.

Le chromogène, même dilué dans le tampon substrat, doit rester incolore. Une coloration bleue spontanée indique une contamination des réactifs.

8- Mettre 0,5 ml de solution de travail de coloration dans tous les tubes. Agiter doucement et incuber 15 mn à température ambiante. Ne pas exposer à une lumière vive pendant l'incubation.

9- Lire les tubes visuellement pour déterminer l'absence ou la présence du rotavirus.

Lecture visuelle

a) Evaluer les tubes visuellement au bout de la période d'incubation de 15 mn du paragraphe 8. Comparer l'intensité de la coloration des tubes à celle du contrôle négatif (diluant échantillon). Le tube de contrôle négatif doit être incolore. Les tubes de contrôle négatif montrant une faible couleur bleue peuvent cependant être utilisés.

b) Les tubes montrant une couleur bleue plus intense que le négatif sont positifs. Les tubes montrant une couleur bleue inférieure ou égale au contrôle négatif sont douteux et doivent être retestés.

Remarque : Ne pas ajouter d'acide. Faire la lecture visuelle 15 mn après addition de la solution de travail de coloration.

7-Recherche du virus Para-influenza type 3 par la technique d'immunofluorescence .

Principe : Monofluo Kit. P.I.3 pour immunofluorescence

Le coffret MONOFLUO Kit P.I.3 sert à la détection du virus Para-influenza type 3 dans les cellules infectées par la technique d'immunofluorescence indirecte utilisant un anticorps monoclonal spécifique du virus.

Cet anticorps se fixe sur l'antigène exprimé dans le cytoplasme des cellules infectées à partir de prélèvement de sécrétions et cellules des voies respiratoires ou après isolement sur cultures cellulaires.

L'addition du conjugué anti-IgG de souris marqué à la fluoresceine permet de rendre fluorescentes les cellules ayant fixé l'anticorps monoclonal.

Le coffret comprend l'anticorps monoclonal spécifique du virus Parainfluenza 3 obtenu à partir des surnageants de culture du clone PI3 5/12, un surnageant de culture témoin et un anti-IgG de souris marqué à l'isothiocyanate de fluoresceine.

Recommandations et précautions d'utilisation

Réactif pour usage in vitro

Ne jamais pipeter par la bouche

Tous les échantillons et les pipettes utilisées pour le prélèvement des échantillons doivent être considérés comme infectieux et doivent être déposés dans une solution désinfectante puis disposés dans des récipients à produits biologiques avant d'être autoclavés. Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb ou le cuivre présents dans les tuyaux d'évacuation et produire ainsi des azides métalliques explosives.

Lors de leur élimination rincer abondamment à grande eau pour éviter la formation de dépôts d'azide.

Prélèvements des échantillons

Le virus est localisé dans les sécrétions et cellules des voies respiratoires supérieures. Pour effectuer le diagnostic direct par immunofluorescence, on prélève les cellules desquamées des sécrétions nasales ou de l'oropharynx.

Traitement des prélèvements avant examen en IF

Au laboratoire plusieurs lavages successifs du prélèvement sont nécessaires pour obtenir une suspension de cellules nasales exempte de mucus.

- Ajouter 5 ml de PBS pour un prélèvement d'environ 1 ml. Agiter doucement.
- Centrifuger à 500g (1500-2000 t/min) pendant 10 minutes à +2-8°C. Découler le surnageant.
- Reprendre le culot par 5 ml de PBS et centrifuger. Renouveler ainsi 2 à 3 fois le lavage pour éliminer totalement le mucus.
- Après la dernière centrifugation ajouter 1 ml de PBS au culot cellulaire. Homogénéiser la suspension par pipetage.
- Déposer les cellules sur les lames (20 µl par puits).
- Effectuer la fixation des cellules et la coloration (voir technique de coloration)

| Réactifs | Présentation | Stabilité |
|---|--|-------------------------------|
| R1 : Anticorps monoclonaux Anti-PI-3 clone PI 3 5/12 contenant 0,1 % d'azide de sodium Volume : 2,5 ml | Surnageant prêt à l'emploi en flacons compte –gouttes | Jusqu'à la date de péremption |
| R2 : Surnageant de culture témoin négatif contenant 0,1 % d'azide de sodium. Volume : 2,5 ml | Surnageant prêt à l'emploi en flacons compte –gouttes | Jusqu'à la date de péremption |
| R3 : Conjugué anti-IgG de souris : Ac de mouton anti-IgG de souris marqués à l'isothycynate de fluoresceine concentré 10 fois Volume : 1 ml | Diluer le contenu avec 9 ml de tampon de phosphate pour obtenir la solution prête à l'emploi en flacons compte-gouttes | 3 mois après dilution |

| | | |
|--|--|----------------------------------|
| R4 : Glycérine tamponnée (milieu de montage) Volume : 3 ml | Glycérol en tampon phosphate prêt à l'emploi en flacons compte- gouttes | Jusqu'à la date de péremption |
|--|--|----------------------------------|

Conservation du coffret : à +2-8°C.

R3 : Conservation à l'abri de la lumière.

Réactifs et matériel nécessaires non fournis

- Acétone
- Pipettes « type Pasteur » stériles.
- Microscope équipé de fluorescence (LEITE Dialux 20 I.L.F.M)
- Tampon PBS MONOFLUO Kit 100 ml
- Lames pour immunofluorescence
- Lamelles

Coloration pour l'examen en fluorescence

Dépôt et fixation des cellules

- a) Par échantillon à tester, déposer 20 µl de cellules infectées sur deux puits d'une lame à immunofluorescence. Le double dépôt permet de tester chaque échantillon avec l'anticorps monoclonal spécifique et le surnageant de culture négatif.
- b) Sécher à l'aide d'un séchoir ou à 37°C ou à température ambiante
- c) Mettre de l'acétone dans un bac à coloration. Laisser les lames dans le bain d'acétone pendant 10 minutes à - 20°C.
- d) Sécher les lames à l'air. Les conserver à - 20°C si la coloration n'est pas effectuée immédiatement.

Dépôt des anticorps

- 1) Déposer une goutte d'anticorps monoclonal spécifique Parainfluenza 3 sur le premier puits (R1)
- 2) Déposer une goutte de surnageant de culture témoin (témoin négatif) sur le deuxième puits (R2)
- 3) Incuber la lame pendant 30 minutes à 37°C en chambre humide
- 4) Préparer le volume de tampon PBS nécessaire pour les lavages en diluant la solution concentrée 10 fois avec de l'eau distillée stérile.

- 5) Le temps d'incubation écoulé, rincer abondamment la lame avec le tampon de lavage PBS, à l'aide d'une pipette. Effectuer ensuite 2 lavages de la lame avec le même tampon.
- 6) Sécher la lame à l'air ou à l'aide d'un séchoir ou simplement essuyer la lame autour du puits.

Coloration

- 1) Diluer le conjugué fluorescent (R3) en ajoutant 9 ml de tampon PBS dilué dans le flacon du coffret. Agiter doucement. Le conjugué dilué est stable pendant 3 mois à + 4°C.
- 2) Déposer une goutte de conjugué (R3) sur chaque puits.
- 3) Incuber pendant 30 minutes à 37°C, en chambre humide
- 4) Laver la lame 2 fois pendant 5 minutes avec le PBS comme précédemment
- 5) Rincer à l'eau distillée puis sécher la lame
- 6) Monter une lame avec la glycérine tamponnée (R4) préalablement tiédie (5 minutes à 37°C). Vérifier l'absence de bulles d'air.

Observation au microscope à fluorescence

Examiner chaque lame au microscope à fluorescence au grossissement X 400.

Lire les lames immédiatement pour obtenir de meilleurs résultats. Il est cependant possible de les conserver à + 2-8°C à l'obscurité pendant 24 heures.

Une réaction est considérée positive lorsqu'une fluorescence verte granulaire est observée dans le cytoplasme des cellules infectées.

Une réaction est négative en l'absence de fluorescence.

INTERPRETATION

| Réactif dans le puits | Anticorps monoclonal PI-3 spécifique | Surnageant de culture témoin | Conclusion |
|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Présence de cellules fluorescentes | + | - | Présence de virus PI-3 |

| | | | |
|-----------------------------------|---|---|--|
| | + | + | Fluorescence non spécifique dans les puits témoin (lavage insuffisant) Réaction à répéter Ininterprétable. |
| Absence de cellules fluorescentes | - | - | Absence de virus PI-3 |

Spécificité des anticorps monoclonaux anti-parainfluenza 3

L'anticorps monoclonal anti-Parainfluenza 3 clone PI 3 5/12 ne présente pas de réactions croisées avec d'autres virus respiratoires.

RESULTATS ET DISCUSSION

1-Pathologie respiratoire

Tous les échantillons ont montré une croissance bactérienne. Les UBFC totales dans les naseaux varient, énormément, d'un animal à un autre et d'un prélèvement à un autre pour un même animal. Les UBFC totales des écouvillons naseaux ont présenté, une augmentation générale bien représentée entre les 5^{ème} et 7^{ème} semaines chez les jeunes veaux et entre les 4^{ème} et 7^{ème} semaines chez les veaux âgés (figures 1 et 2).

Plusieurs espèces bactériennes ont été isolées des écouvillons nasaux, durant toute la période expérimentale. Les principales espèces bactériennes isolées sont Staphylococcus spp., Streptococcus spp., les Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida, Neisseria spp., E.coli., Corynebacterium spp. et Pseudomonas spp. Les bactéries prédominantes qui ont été quantifiées sont Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Pasteurella haemolytica et Pasteurella multocida.

Les staphylocoques et les streptocoques étaient les organismes dominants dans la cavité nasale des jeunes veaux et des veaux âgés formant à eux-seuls 47,12 % chez les jeunes et 43,93 % chez les veaux âgés, au premier prélèvement. Cette tendance reste, presque, stationnaire durant toute la période expérimentale.

Pasteurella haemolytica, quoique présente dans les écouvillons nasaux, était beaucoup moins importante en nombre, aussi bien, chez les jeunes veaux, que chez les veaux âgés (tableau I).

L'allure de la colonisation des naseaux par les espèces bactériennes dominantes augmente avec l'âge.

* Exemple : Nous remarquons, que le pourcentage de Pasteurella haemolytica et des staphylocoques, est plus important chez les jeunes (13,61 % et 26,33 %) (tableau II) que chez les adultes (11,48 % et 16,65 %), alors que les streptocoques ont un pourcentage d'isolement similaire dans les deux groupes (18,37 % chez les jeunes veaux et 17,77 % chez les veaux âgés) (tableau III).

1.1-Effets du temps du prélèvement

Chez les jeunes veaux, le temps du prélèvement avait un effet significatif sur la flore bactérienne totale entre la 1^{ère} et la 4^{ème} semaine ($p < 0,01$) et entre la 4^{ème} et la 7^{ème} semaine ($p < 0,05$).

En ce qui concerne l'étude des UBFC des espèces bactériennes étudiées, le temps du prélèvement n'avait aucun effet significatif sur la variation, excepté pour Staphylococcus spp. entre les 1^{ère} et 4^{ème} semaines ($p < 0,05$) et les 4^{ème} et 7^{ème} semaines ($p < 0,05$). Les variations des UBFC de Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida et Streptococcus spp., n'ont présenté aucune augmentation ou diminution significatives ($p > 0,05$). Chez les veaux âgés, nous avons noté un effet significatif entre les 4^{ème} et 7^{ème} semaines pour les UBFC totales ($p < 0,05$), un effet pour les staphylocoques entre les 1^{ère} et les 4^{ème} semaines ($p < 0,025$) et entre les 1^{ère} et 7^{ème} semaines ($p < 0,01$) et un effet pour les Pasteurella haemolytica entre les 1^{ère} et 4^{ème} semaines ($p < 0,025$) uniquement.

1.2-Comparaison des UBFC totales chez les veaux jeunes et âgés

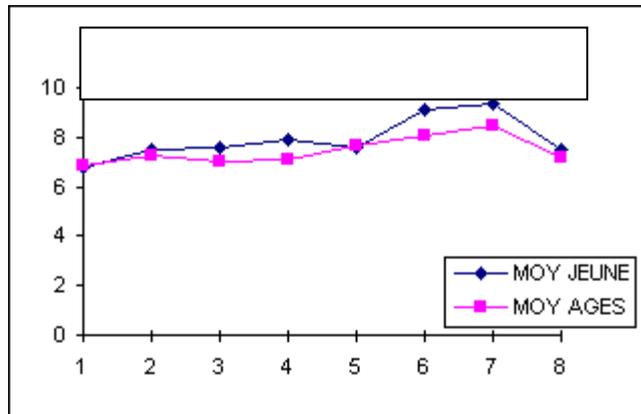
Aucune différence significative sauf à la 7^{ème} semaine du prélèvement (tableau IV).

Pour les espèces bactériennes, une différence, très significative, a été observée à la 4^{ème} semaine du prélèvement ($p < 0,001$) pour Staphylococcus spp.

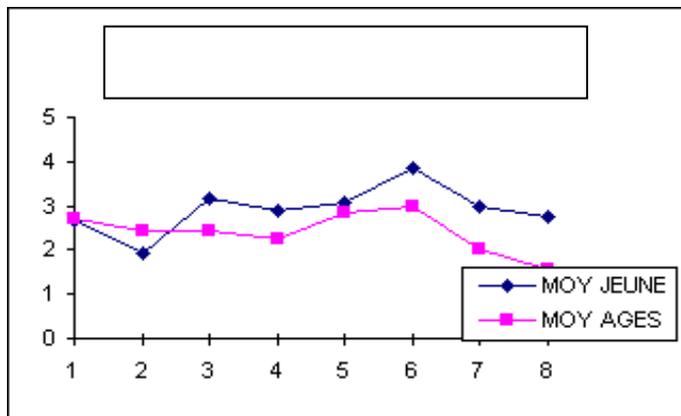
1.3-Signes cliniques

De la toux a été observé chez les veaux jeunes avec des larmoiements et des épiphoras. Il n'y avait aucune relation directe entre les signes cliniques observés, les UBFC totales et les UBFC des différentes espèces bactériennes isolées.

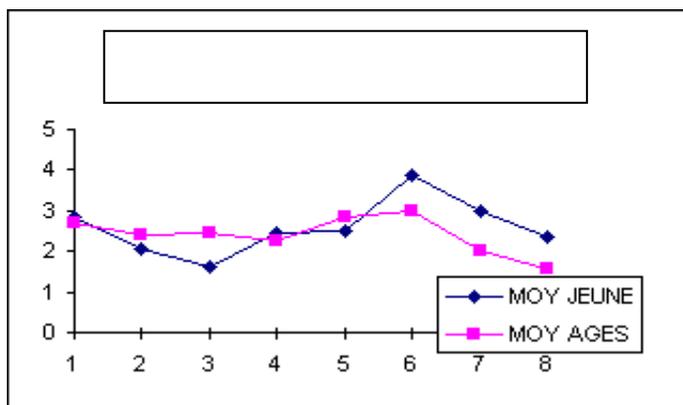
**Figure 1 : variation de la colonisation bactérienne nasale totale
chez les veaux jeunes et âgés**



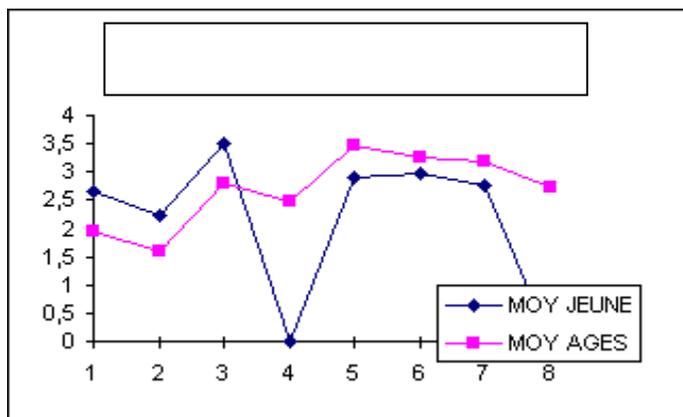
**Figure 2 : variation de la colonisation bactérienne nasale par St.spp.
chez les veaux jeunes et âgés**



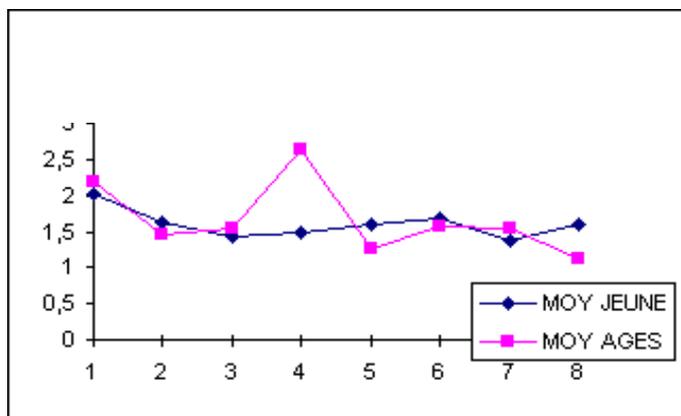
**Figure 3 : variation de la colonisation bactérienne nasale par Str.spp.
chez les veaux jeunes et âgés**



**Figure 4 : variation de la colonisation bactérienne nasale par E.coli.
chez les veaux jeunes et âgés**



**Figure 5 : variation de la colonisation bactérienne nasale par P.haemolytica
chez les veaux jeunes et âgés**



**Figure 6: variation de la colonisation bactérienne nasale par
Corynebacterium pyogenes chez les veaux jeunes et âgés.**

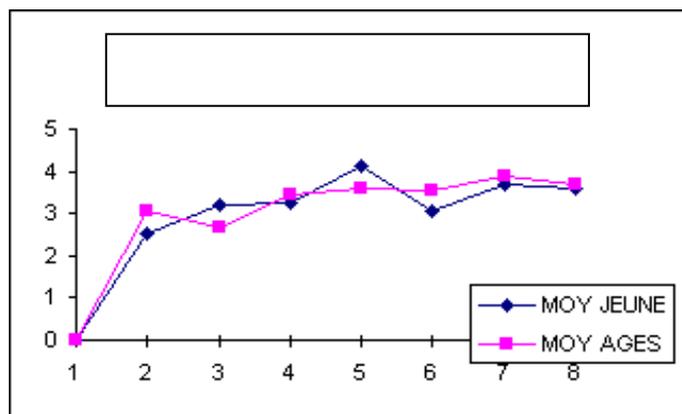


Tableau 1 : Variation de la colonisation nasale par P.haemolytica

chez les veaux jeunes et âgés.

| Semaine | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Jeunes | 1,34±1,08 | 1,37±0,80 | 1,19±0,68 | 1,00±0,80 | 1,07±0,88 | 0,83±0,91 | 1,14±0,62 | 0,53±0,84 |
| Agés | 1,62±0,96 | 0,96±0,79 | 0,74±0,82 | 0,43±1,07 | 0,95±0,80 | 1,00±0,81 | 0,97±0,81 | 0,86±0,59 |

Tableau 2 : Variation de la colonisation nasale par Staphylococcus spp.

chez les veaux jeunes et âgés.

| Semaine | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Jeunes | 1,78±1,46 | 1,61±1,01 | 2,64±1,81 | 2,90±0,70 | 2,10±1,59 | 1,92±2,21 | 1,48±1,73 | 1,99±1,05 |
| Agés | 1,90±1,47 | 1,52±1,19 | 0,37±0,92 | 0,43±1,70 | 2,08±1,62 | 1,23±1,38 | 0,34±0,84 | 0,39±0,78 |

Tableau 3 : Variation de la colonisation nasale par Streptococcus spp.

chez les veaux jeunes et âgés.

| Semaine | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Jeunes | 1,42±1,62 | 1,70±0,95 | 0,27±0,66 | 1,62±1,36 | 0,83±1,33 | 2,19±1,80 | 1,90±0,95 | 1,79±1,04 |
| Agés | 1,11±1,26 | 1,17±1,29 | 1,16±1,30 | 1,35±1,49 | 0,95±1,14 | 1,45±1,61 | 2,32±1,96 | 1,18±1,37 |

Tableau 4 : Variation de la colonisation nasale totale chez les veaux jeunes et

âgés.

| Semaine | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Jeunes | 6,79±1,72 | 7,49±1,38 | 7,55±0,44 | 7,49±1,47 | 7,60±1,06 | 9,08±0,79 | 9,34±1,29 | 7,49±0,81 |
| Agés | 6,85±0,97 | 7,22±1,30 | 6,99±1,10 | 7,11±1,27 | 7,65±1,05 | 8,07±0,78 | 8,48±0,99 | 7,15±0,60 |

1.4-DISCUSSION

Les maladies respiratoires des veaux, en particulier la pneumonie sont considérées comme l'un des problèmes les plus épineux pour l'élevage bovin dans le monde. Il est le résultat d'une interaction de plusieurs agents infectieux sous l'influence du stress physique. Il existe des évidences empiriques et expérimentales, qui suggèrent que l'âge de l'animal pourrait influencer l'incidence et la sévérité des maladies respiratoires chez les bovins (Dennis, 1986). Dans cette étude, deux groupes de veaux ont été utilisés pour l'investigation de l'effet de l'âge sur le développement de la flore bactérienne nasale.

L'étude de la flore bactérienne, dans un même groupe d'âge, a montré que les UBFC totales étaient similaires excepté entre les 1^{ère} et 4^{ème} semaines pour les jeunes veaux et entre les 4^{ème} et 7^{ème} semaines pour les veaux jeunes et âgés.

L'étude des espèces bactériennes isolées permet de remarquer que Staphylococcus spp. et Pasteurella haemolytica représentent un pourcentage d'isolement plus important chez les jeunes que chez les adultes. Ceci pourrait expliquer la plus grande sensibilité des animaux jeunes aux maladies respiratoires, par rapport aux animaux plus âgés. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs (Magwood et al., 1969 ; Jones et Webster, 1984). Dans cette étude, les veaux utilisés souffrent d'une faiblesse générale et de difficultés respiratoires chroniques. Les résultats similaires ont été rapporté par d'autres chercheurs (Nakaya et al., 1985 ; Emad, 1989). Sayed et al. (2001), ont isolèrent P.multocida dans 21,54% des prélèvements, alors que Abdelmawla et Ahmed isolèrent Streptococcus spp et E.coli des poumons pneumoniques des veaux dans 10,90 et 10,00% respectivement.

Nos résultats confirment ceux de Abdelkader (1992) qui isola Streptococcus pyogenes et E.coli des poumons pneumoniques de veaux un taux de 8,69 et 13,04%. De même, Ismail (1993), isola E.coli à un pourcentage de 9,90% et Staphylococcus aureus à 8,20%. Dans une autre étude, Pasteurella haemolytica était isolé dans 5,50% et Corynebacterium pyogenes dans 2,70% des prélèvements (Ismail et al., 1993). Les résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs (Khan et Khan, 1997 ; Tegtmeier et al., 1999).

Pasteurella haemolytica prend origine des sites de prolifération dans le nasopharynx. Cette bactérie généralement considéré comme la plus virulente et la plus souvent associée avec les mortalités de moins de 6 mois.

En conclusion, on peut dire que les bovins hébergent généralement plusieurs agents pathogènes pour l'appareil respiratoire, mais ces microorganismes se comportent comme commensaux chez les animaux maintenus dans de bonnes conditions d'élevage. En conséquence, dans les conditions normales, la présence de ces microorganismes est d'une

signification mineure. Par contre, des situations stressantes conduisent à la prolifération de ces microorganismes, à un déséquilibre du rapport hôte-agent et à une augmentation d'incidence de la pneumonie. Les infections virales, le transport, les températures extrêmes, le surpeuplement et le regroupement dans les marchés et les foires d'animaux de statuts microbiologique et immunologique et d'âges différents peuvent conduire à la prolifération de microorganismes potentiellement pathogènes. Ces mêmes facteurs peuvent inhiber les défenses pulmonaires et provoquer des lésions pulmonaires. La combinaison d'un nombre élevée de microorganismes dans l'air inspiré et une capacité réduite du poumon d'éliminer ces microorganismes conduit fréquemment à l'infection du poumon. Cette observation, quoique nécessitant une recherche plus approfondie, a le mérite d'être exploitée cliniquement et de conseiller les éleveurs, surtout ceux qui pratiquent l'engraissement des taurillons, de n'acheter que des veaux âgés (par exemple de plus de six mois d'âge).

Les résultats de cette étude pourraient ne pas refléter la réalité de la colonisation quantitative et/ou qualitative des voies respiratoires profondes et des poumons mais permettent, néanmoins, de prédire le risque d'apparition d'une pathologie respiratoire surtout lorsque la colonisation des voies respiratoires supérieures coïncide avec un climat froid et/ou humide et des infections virales principalement le Para-influenza type 3 (P13) et le virus respiratoire syncytial (VRS).

Des résultats plus complets seront obtenus après l'étude sérologique virale de ces deux principaux virus. Des études expérimentales englobant la maîtrise des conditions de l'environnement et l'inoculation de germes à des veaux ou des agneaux d'âges différents permettent une meilleure compréhension de la complexité de la pathologie respiratoire et, par conséquent, la mise en place d'un programme prophylactique médical, sanitaire ou médico-sanitaire adéquat pour réduire les pertes énormes dont souffre l'élevage bovin.

1.5-Rapport entre la colonisation bactérienne et les signes cliniques

Les veaux des deux groupes n'ont pas présenté des signes cliniques respiratoires graves même lorsque les UBFC totales dans les écouvillons nasaux étaient très élevés. Cette trouvaille est en accordance avec les résultats de Rutter (1987). Cet auteur n'a trouvé aucune corrélation positive entre le nombre de Bordetella bronchiseptica dans les écouvillons nasaux et la rhinite atrophiante du porc. De même, Magwood et al (1969) ; Frank et Smith (1983) ; Jones et Webster (1984) ; Woldehiwet et al. (1990) n'ont pas trouvé qu'un nombre élevé de Pasteurella spp dans les cavités nasales ou dans le nasopharynx est positivement corrélé avec la pneumonie. Néanmoins, Hoerlein et al (1961) Frank et Briggs,

(1992) et Frank et al (1995) ont prouvé qu'il y aurait une corrélation positive entre le nombre de bactéries isolées des écouvillons nasaux et la pneumonie des veaux.

Cette corrélation positive pourrait être due au nombre très important d'échantillons examinés. Il est probable qu'un nombre élevé de micro-organismes naturellement peu pathogènes pourrait avoir une influence sur l'apparition et sévérité des maladies respiratoires s'il coïncide avec une période d'augmentation de la sensibilité.

2. Pathologie digestive

2.1-bactériologie

Tableau n°1 : Nombre d'Eschérichia coli (BFC log₁₀/gramme de fécès) et existence de l'adhésine K₉₉ (*) chez les veaux jeunes.

| Prélèvements | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Veaux | | | | | | | | |
| Veau 1 | 4.30 | 4.76 | 5.23 | 5.06 | 7.28 | 6.83 | 6.32 | 8.60 |
| Veau 2 | 6.05 | 7.21 | 7.81 | 6.73 | 7.13 * | 7.66 | 8.04 * | 5.56 * |
| Veau 3 | 5.26 | 6.22 | 6.71 | 6.86 | 5.06 | 4.93 | 5.01 | 7.26 * |
| Veau 4 | 7.74 | 8.36 | 7.61 | 6.13 | 8.56 | 7.83 * | 6.86 | 8.21 |
| Veau 5 | 4.87 | 5.03 | 5.14 | 5.72 | 5.36 | 6.33 | 6.03 | 7.08 * |
| Veau 6 | 7.63 | 7.71 | 6.91 | 6.32 | 7.87 | 8.41 | 7.88 * | 8.47 * |
| Moyenne ± Ecart type | 5.98± 1.17 | 6.55± 1.21 | 6.57± 0.92 | 6.14± 0.50 | 6.88± 1.11 | 7.00± 0.97 | 6.69± 0.90 | 7.53± 0.90 |

Les colibacilloses représentent encore une des principales causes de pertes économiques de l'élevage bovin dans la plupart des pays.

Tout d'abord, contrairement à des espèces pathogènes comme Salmonella spp, la pathogénicité d'E. coli ne peut être liée à sa seule présence dans l'intestin du veau malade puisque E. coli est un hôte normale du colon et du caecum, s'implantant dès la naissance chez le jeune. Exemple, Smith (1965) ; Contrepois et Gouet, (1973, 1977), en suivant l'évolution des genres bactériens dominants (E.coli, Clostridium, Streptococcus, Lactobacillus, Bacteroides) chez des veaux sains âgés de quelques heures à 24 jours, ont montré qu'E.coli apparaît chez l'animal âgé de 8 heures.

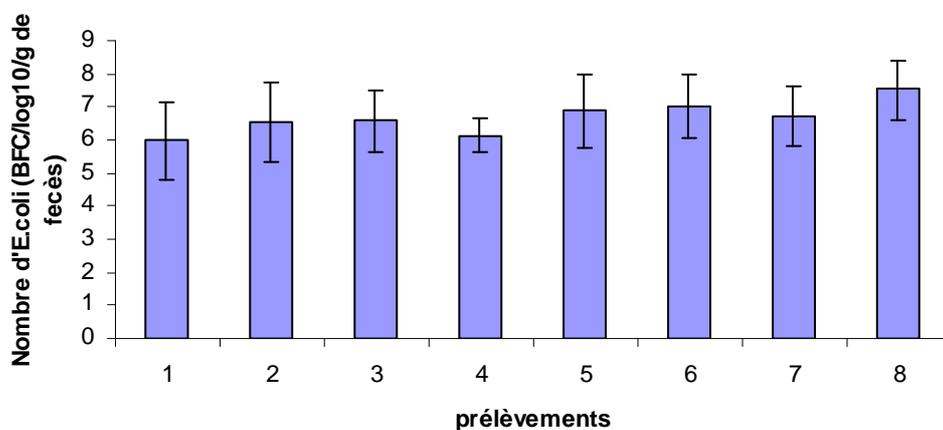
Au plan qualitatif, il s'avère en premier lieu que les souches d'E.coli isolées des veaux sains (E.coli saprophytes) possèdent des caractères tout à fait différents de ceux des veaux malades (E.coli pathogènes).

Tableau n°2: Nombre d'Escherichia coli (BFC log₁₀/gramme de fécès) et existence de l'adhésine K₉₉ (*) chez les veaux âgés.

| Prélèvements | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Veaux | | | | | | | | |
| Veau 1 | 5.21 | 3.71 | 4.86 | 5.02 | 5.36 | 6.22 | 5.87 | 5.29 |
| Veau 2 | 6.36 | 5.93 | 3.76 | 4.31 | 6.21 | 6.78 * | 3.92 | 6.64 * |
| Veau 3 | 7.28 | 5.78 | 5.26 | 6.09 | 5.12 | 7.06 | 7.13 | 7.26 * |
| Veau 4 | 6.04 | 7.06 * | 3.87 | 4.37 | 6.64 | 7.21 * | 8.77 * | |
| Veau 5 | 6.17 | 6.54 | 5.52 | 5.62 | 5.77 | 3.83 | 6.73 * | 7.87 * |
| Veau6 | 4.91 | 6.21 | 4.83 | 6.08 | 6.66 | 6.82 * | 7.71 * | 8.77 * |
| Moyenne ± Ecart type | 6.00± 0.62 | 5.87± 0.75 | 4.68± 0.58 | 5.25± 0.68 | 5.94± 0.54 | 6.32± 0.86 | 6.69± 1.20 | 7.17± 0.96 |

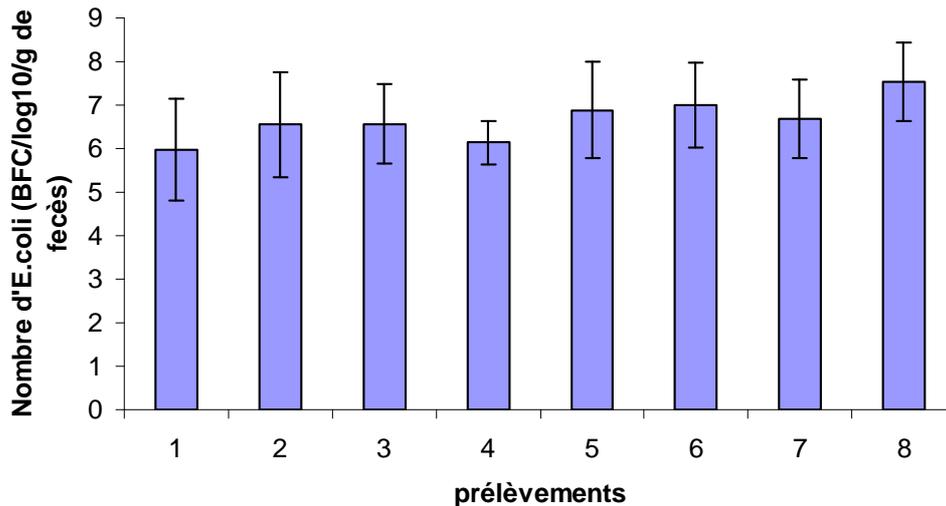
D'autre part, il a été démontré que comparativement aux animaux sains, la microflore des veaux atteints de diarrhée se caractérise par une augmentation générale du nombre de bactéries anaérobies facultatives, principalement des E.coli mais également des streptocoques et des lactobacilles.

Figure 8 : Nombre d'Escherichia coli (BFC log₁₀/gramme de fécès) chez les veaux jeunes.



Cette augmentation est particulièrement prononcée dans la caillette et l'intestin grêle et la population bactérienne, y compris E.coli est très élevée dans les fèces (Gouet et al; 1980).

Figure 9 : Nombre d'Escherichia coli (BFC log₁₀/gramme de fèces) chez les veaux âgés.



Les maladies entériques des animaux forment un syndrome complexe dans lequel sont impliqués une multitude d'agents infectieux, des agents opportunistes et des facteurs précipitants. Toutefois, il y a une évidence croissante que certaines souches d'E.coli sont fréquemment impliquées dans les désordres du tractus intestinal des veaux et des agneaux nouveau-nés.

La colibacillose entérique comprend probablement la séquence d'événements suivant :

- (1) l'infection par les E.coli entéropathogènes,
- (2) la prolifération de ce microorganisme dans l'intestin grêle,
- (3) la formation et la libération de toxine(s) et
- (4) le développement des lésions.

La diarrhée néonatale, en Grande Bretagne dans laquelle E.coli était impliquée représentait 26 % et 17 % de tous les diagnostics réalisés chez les veaux et les agneaux malades respectivement (Sojka,1981).

Pour qu'un E.coli provoque de la diarrhée chez un hôte sensible, il doit posséder au moins, deux déterminants de virulence. Il doit être capable de coloniser l'intestin grêle ; ce qui est assuré par des antigènes de colonisation ou adhésines (exemple K₈₈, K₉₉) et doit être capable de produire une entérotoxine qui provoque la diarrhée.

2.2-Rotavirus

Groupe 1 : moyenne d'âge : 1 mois

| Prélèvement \ Test | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Total positif | Pourcentage |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---------------|-------------|
| Agglutination au latex | 3 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 13/47 | 27.66 |
| ELISA | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 15/47 | 31.91 |

Groupe 2 : moyenne d'âge : 6 mois

| Prélèvement \ Test | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Total positif | Pourcentage |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---------------|-------------|
| Agglutination au latex | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 8/48 | 16.66 |
| ELISA | 3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 10/48 | 20.83 |

95 échantillons de fèces ont été testés pour la présence de rotavirus par la méthode d'agglutination au latex (Pastorex) et le test ELISA basé sur l'utilisation des anticorps monoclonaux de la protéine virale 6 (VP6) (PATHFINDER).

Les résultats des deux tests sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

On remarque que l'excrétion du rotavirus est plus importante chez les veaux jeunes (la moyenne d'âge 1 mois) que chez les veaux âgés (la moyenne d'âge 6 mois).

Le test ELISA utilisé dans cette étude était capable de détecter le rotavirus dans 20,83 % et 31,91 % contre des prélèvements 16,66 % et 27,66 % obtenus par le test d'agglutination au latex.

Quoi que le pourcentage des échantillons rotavirus positifs par agglutination au latex est proche du pourcentage détecté par ELISA les résultats faux positifs et négatifs par le test au latex ont été clairement démontrés.

Il y aurait des échantillons positifs par ELISA et négatifs par agglutination (G1 : P5, P7 et P8) et (G2 : P1, P2, P3 et P5) et des échantillons rotavirus positifs par agglutination au latex et négatifs par ELISA (G1 : P3) et (G2 : P4, P7 et P8).

Ces résultats pourraient être de faux résultats positifs. Les différences détectées dans les pourcentages des échantillons positifs quand on applique les deux tests prouvant les hautes sensibilités et spécificité de l'ELISA utilisé dans cette étude. Il faut souligner ici que les

veaux utilisés dans cette étude sont issus de mères non vaccinées contre le rotavirus. Ceci suppose que ces veaux ont été exposés aux rotavirus durant et après la parturition. Il faut également noter qu'au début de l'étude la diarrhée était très présente. Ceci expliquerait l'excrétion virale chez un nombre plus important aussi chez les veaux jeunes que les veaux âgés. A la fin de l'étude le nombre d'animaux excréteur le rotavirus diminue considérablement dans les deux groupes d'âges.

Discussion

Comme il y a peu d'information disponible sur le rotavirus et sa diversité en Algérie, cette étude présente un essai de mise en évidence du rotavirus dans un élevage bovin en Algérie.

Le Rotavirus a été détecté dans les échantillons des fèces collectées de veaux d'âges différents et souffrant de diarrhée du moins au début de l'étude. Pour cela l'agglutination au latex et l'ELISA ont été utilisées pour la détection rapide du rotavirus dans des fécaux.

Plusieurs investigateurs ont utilisé rapidement pour détecter le rotavirus dans des échantillons fécaux comme l'ELISA, la microscopie électronique, l'immuno-microscopie électronique et l'agglutination au latex. [Benfield, Stotz, Nelson et Grosn, (1984) ; Ellens et DeLeeuw, (1977) ; Hermann, Blacklow, Perron, Cukor, Krause, Hyans, Barrett et Ogra, (1985) ; Falcon, Tarantino, Dijrani, Cordili, Lavezza et Tollis, (1999) ; Al-Yousif, Al-Majhdi, Chard-Bergstrom, Anderson et Kapil, S. (2000) ; Al-Yousif, Anderson, Chard-Bergstrom, Bustamant, Muenzenberger, Austin et Kapil. (2001)]. ELISA était plus sensible et plus efficace que les autres tests. (Ellens et DeLeeuw, 1977).

Comme les autres tests l'ELISA est capable de détecter l'exact statut des échantillons avec une sensibilité et une spécificité supérieure à celle de l'agglutination au latex. Les différences dans les résultats entre l'agglutination au latex et l'ELISA ont été observées. Cela est attendu à cause de la présence des résultats faussement positifs dans le test d'agglutination au latex. Le succès de l'ELISA utilisé dans cette étude, prouve son efficacité et sa sensibilité et confirme sa performance dans la détection du rotavirus dans des prélèvements fécaux comme l'a déjà prouvé une étude réalisée au Québec [Hussein, Cornaglia, Saber et EL-Azhary (1995)]. Ce test a été développé et modifié pour être plus sensible et plus spécifique dans la détection directe du rotavirus. Le VP6-ELISA utilisé dans cette étude a prouvé la présence du rotavirus chez les veaux avec un pourcentage de 31,91 % et 20,83 %.

Les études épidémiologiques et immunologiques des infections à rotavirus ont été améliorées par la capacité de déterminer les serotypes de rotavirus impliqués. La prévalence du rotavirus du groupe A a été décrite dans différents pays comme les USA (Lucchelli, Lance,

Barlett, Miller et Saif, 1992) ; l'Argentine (Bellinzoni , Blackhall, Mattion, Estes ,Snodgrass, LaTorre et Scodller, 1989) ; le Royaume uni (Snodgrass, Fitzgerald, Campbell, Scott, Browning, Miller,Herring et Greenberg, 1990) ; le Quebec (Hussein et al., 1995) ; la France (Vende, Karoum, Manet, Rizet, Schelcher, Cohen et Navetat, 1999).

Dans cette étude, on a démontré que le rotavirus bovin du sérotype G₆ est le virus circulant dans l'élevage bovin en Algérie comme dans plusieurs autres pays.

D'autres études plus poussées sont nécessaires pour l'isolement du sérotype G₆ du rotavirus et la détermination de sa prévalence.

2.3- Le virus Parainfluenza type-3 (PI-3) :

Groupe 1 : moyenne d'âge : 1 mois

| Prélèvement | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Total | pourcentage |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|-------------|
| Résultats | | | | | | | | | | |
| Positifs (+) | 2 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 10/47 | 21,27 |
| Négatifs (-) | 4 | 4 | 3 | 6 | 5 | 4 | 6 | 5 | 37/47 | 78,72 |

Groupe 2 : moyenne d'âge : 6 mois

| Prélèvement | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Total | pourcentage |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|-------------|
| Résultats | | | | | | | | | | |
| Positifs (+) | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 08/48 | 16,66 |
| Négatifs (-) | 3 | 4 | 6 | 6 | 5 | 5 | 6 | 5 | 40/48 | 83,33 |

Le virus PI-3 est ubiquiste et capable de produire une pneumonie interstitielle (Radostits et al., 2000). Il a été suggéré que les tractus respiratoires supérieur et inférieur sont les cibles primaires de l'infection par le virus PI-3 (Bellini et al., 1998). La pneumonie virale due à l'infection par le virus PI-3 non compliquée par une infection secondaire est généralement de moindre importance (Radostits et al., 2000). Néanmoins, dans cette étude, des épisodes de signes respiratoires plus ou moins sévères ont été observés dans le lot des jeunes veaux. Cette trouvaille est en accord avec celle de Castrucci et al. (1992) qui prouvèrent que l'infection

simultanée des veaux par le BVD-MD et le virus PI-3 induit l'apparition de signes cliniques sévères.

Cette étude a permis la mise en évidence de l'antigène viral du virus PI-3 à une moindre fréquence en comparaison avec d'autres auteurs qui ont utilisé la technique d'isolement direct du virus ou l'inhibition de l'héماغglutination (Selim et al., 1998 ; Bellini et al., 1998). Cette différence pourrait être attribuée à l'utilisation de sécrétions nasales congelées car la congélation et la décongélation détruisent un certain nombre de cellules qui hébergent l'antigène viral et qui donnent un résultat négatif à l'immunofluorescence (Castrucci et al., 1992 ; Sayed et Ali, 2001).

Chapitre I : Pathologie respiratoire

1. Agents étiologiques :

1.1. Les infections naturelles :

1.1.1. Bactéries :

Quoique les bactéries aient été incriminées dans les maladies respiratoires bovines pendant longtemps, leur rôle dans la pathogénie de ces maladies demeure encore incertain (Jennings et Glover, 1952 ; Omar,1966 ; Ide,1970 ; Baudet, Chieze et Espinasse,1994). Des bactéries potentiellement pathogènes telles que Pasteurella spp., Haemophilus somnus, Corynebacterium pyogenes et Escherichia coli ont été isolés de poumons pneumoniques de bovins (Thorpe, Shigley et Farrell,1942 ; Carter et Rowsell,1958 ; Magwood, Barnum et Thompson,1969 ; Viring, Boleske, Franklin, Reh binder, Segal et Troedsson, 1988), mais il reste incertain si ces microorganismes sont capables de provoquer des maladies respiratoires tous seuls. La majorité de ces bactéries ont été isolées des trachées et des nasopharynx de veaux non pneumoniques mais généralement leurs nombres étaient inférieurs à ceux observés chez des veaux pneumoniques (Hamdy et Trapp,1967 ; Magwood et al.,1969 ; Corstvet, Panciera, Rinker,Stark et Hooward ,1973 ; Viring et al.,1988).

Pasteurella spp. sont considérées comme des agents pathogènes provoquant des entités nosologiques différemment connues comme la pasteurellose pulmonaire bovine, la fièvre de transport et la pneumonie enzootique des bovins (Heddleston, Reisinger et Watko, 1962 ; Hetrick, Chang, Byrne et Hansen, 1963 ; Baudet et al., 1994). Néanmoins, à cause de leur présence aussi bien dans les poumons pneumoniques que dans les poumons non-pneumoniques, leur rôle dans les maladies respiratoires bovines n'est pas complètement élucidé.

Quelques évidences suggèrent que P. haemolytica et P. multocida pourraient être des microorganismes importants dans les maladies respiratoires et ce par comparaison de la fréquence d'isolement des deux microorganismes des poumons de bovins sains et pneumoniques (Reisinger, Heddleston et Manthei, 1959 ; Hoerlein, Saxena et Mansfield, 1961 ; Mraz, Sisak et Jelen, 1980, Confer, Panciera, Clinkenbeard, 1990 ; Whiteley, Maheswaran et Weiss, 1992). Les nombres de P. haemolytica sont, également, d'une grande signification dans les maladies respiratoires des bovins car ils sont plus importants chez les bovins pneumoniques que les bovins sains (Corstvet et al., 1973 ; Thomson, Chander, Savan et Fox, 1975 ; Martel, David, Bonmier, Michel, Gerard et Frappier, 1986 ; Loan, Purdy et Zehr, 1996). En ce qui concerne le tractus respiratoire profond, il existe des observations

contradictoires sur la présence de Pasteurella spp. dans les poumons de bovins sains. Collier et Rossow (1964) suggéraient que Pasteurella spp. n'étaient pas des habitants normaux du tractus respiratoire profond mais Allan (1978) a isolé P. haemolytica et P. multocida des poumons de bovins sains.

P. haemolytica est plus incriminé dans les maladies respiratoires bovines que P. multocida car il est plus fréquemment et plus abondamment isolé des poumons de bovins pneumoniques (Thomson, 1974 ; Allan, 1978 ; Thomson, 1980 ; Slocombe, Mulks, Kullings et Worth, 1990).

Pass et Thomson (1971) examinèrent des écouvillons nasaux ante-mortem et préparèrent des cultures de 15 sites différents de la cavité nasale de veaux sains à l'abattoir. Ils trouvèrent que P. haemolytica était largement répandu sur les 15 sites de la muqueuse nasale et que ce micro-organisme était présent sur la muqueuse nasale où les écouvillons nasaux pris in vivo étaient négatifs. Ceci suggère que des écouvillons nasaux uniques peuvent sous-estimer la réalité de portage chez les bovins. Ils révélèrent également que P. haemolytica était présent à la surface mais jamais entre ou à l'intérieur des cellules épithéliales.

P. haemolytica biotype A sérotypes 1 et 2 sont les plus communément isolés des écouvillons naso-pharyngés , des poumons de porteurs sains et des poumons pneumoniques (Wray et Thompson, 1971 ; Frank, Briggs et De Bey, 1993 ; Frank, Briggs et Zehr, 1995). Lillie (1974) révéla que P. haemolytica A₁ était prédominant dans les maladies respiratoires bovines.

P. multocida sérotype A causait la maladie respiratoire alors que les types B et E étaient impliqués dans la septicémie hémorragique (Carter, 1967 ; Shoo, Wiseman et Allan, 1990).

D'autres espèces bactériennes ont été incriminées dans les maladies respiratoires bovines. Par exemple , des infections respiratoires ont été associées avec Haemophilus somnus. Ces infections semblent se développer en deux entités cliniques séparées :

- 1- Une maladie respiratoire associée à ou précédant une méningo-encéphalite thrombo-embolique (METE) affectant des bovins âgés de 1 à 3 ans et
- 2- Un syndrome de pneumonie aiguë des veaux (Humphrey et Stephens, 1983 ; Harris et Janzen, 1989, Baudet et al., 1994).

Saunders, Thessen et Janzen (1980) établirent que la maladie respiratoire associée avec H. somnus est généralement caractérisée par une pneumonie fibrineuse et une pleurésie. Néanmoins, Brown, Dillman et Dierks (1970) incriminèrent H. somnus dans la fièvre de transport et dans une trachéite polypoïde résultant en une toux chronique. Pritchard

et McLeod (1977), Roberts, Wood, Hunter, Munro et Imray (1979), Baroux (1991) décrivent des syndromes de mort subite de pneumonie de veaux chez lesquels H. somnus a été isolé. Pritchard, Shreave et Bradley (1979) associent des foyers de maladies respiratoires des veaux dus à des infections à H. somnus.

Gourlay, Flanagan et Wyld (1982) isolèrent un micro-organisme qu'ils nommèrent Streptobacillus actinoides de 12 des 56 poumons. Ces microorganismes ressemblent à ceux auparavant décrits comme étant Bacillus actinoides ou Actinobacillus actinoides. Après inoculation intratrachéale de deux souches de ces microorganismes une consolidation pulmonique se développa chez cinq des six veaux gnotobiotiques et concernait jusqu'à 16% de la surface pulmonaire. Des lésions histologiques de pneumonie interstitielle étaient observées dans les poumons des six veaux.

En France, Baudet et al. (1994) isolèrent Streptococcus mitis dans un des sept élevages étudiés. Ils suggèrent que cette espèce bactérienne pourrait jouer un rôle non négligeable dans le développement des broncho-pneumonies chez des taurillons à l'engrais.

1.1.2. Virus :

Une multitude de virus ont été isolés des veaux souffrant de maladies respiratoires et des virus additionnels vont probablement être retrouvés dans le futur (Bryson, 1985 ; Antoine et Pastoret, 1988 ; Baroux, 1991 ; Van Der Poel, Kramps et Middel, 1993). Des infections simultanées par deux ou plusieurs virus à la fois sont souvent observées dans un seul foyer de maladie respiratoire bovine (White et Fishman, 1972 ; Bryson, Mc Ferran, Ball et Neill, 1979 ; Schelcher, Espinasse, Savey, Jouglar et Bezille, 1988, Baudet et al., 1994).

Les virus les plus fréquemment isolés dans les foyers de pneumonie des veaux sont le virus parainfluenza type 3 (PI-3), le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB), le virus de la diarrhée à virus / maladie des muqueuses (BVD / MD) (Stott, Thomas, Collins, Hamilton, Jebett et Luther, 1978 ; Pastoret, Thiry et Savey, 1988 ; Baroux, 1991 ; Baudet et al., 1994). Ces virus sont largement répandus dans les populations bovines de la majorité des pays et des enquêtes sérologiques ont révélé une prévalence élevée de séroconversion à ces virus (Paccaud et Jacquier, 1970; Wellemans, Leunen et Luchsinger, 1970 ; Philip et Derbyshire, 1971 ; Jacobs et Edington, 1971 ; Philip, 1973 ; Potgieter et Aldridge, 1977 ; Bryson, Mc Ferran, Ball et Neill., 1978 ; Wiseman et Pirie, 1979 ; Mohammed Ali, Shehab, Abderrahim, 2002). Stott et al. (1978) réalisèrent une étude qui s'était étalée sur trois années et portant sur l'étude des maladies respiratoires dans une unité d'engraissement. Un nombre important d'infections virales ont été identifiées comprenant des réovirus, des rhinovirus, des

entérovirus et des adénovirus mais seulement les virus PI-3 et le VRSB ont été significativement incriminés dans des foyers de maladies respiratoires ($P < 0,01$).

L'intervention de l'Herpes Virus Bovin type -1 (HVB-1), l'agent causal de la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR), est bien établie et expérimentalement élucidée. D'excellentes revues bibliographiques sur le sujet sont déjà disponibles (Gibbs et Rweyemamu, 1977 ; Yates, 1982 ; Roizman, Desrosier, Fleckenstein, Lopes, Minson et Studdert, 1992 ; Rijsewijk, Kaahoeke, Langeveld, Meloen, Judek, Bienkowska-Szewezyk, Marie-Veldehuis et Van oirschot., 1999 ; Schroder et Keil, 1999 ; Sara, Molesworth, Cathleen, Lake, Borza, Turk et Hunt-Fletcher 2000).

1.1.3. Les infections mixtes bactéries-virus :

L'idée qu'il pourrait y avoir une action synergique entre les virus et les bactéries se développa à partir d'observations durant et après les grandes pandémies de grippe humaine au cours des 19^{ème} et 20^{ème} siècles (Yates, 1982 ; Frank, Briggs et Loan, 1994). Il existe une évidence qui suggère, que chez les bovins, une synergie s'exerce entre les virus et les bactéries.

Par exemple, Pasteurella spp. pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse des maladies respiratoires. A partir d'investigations dans des cas de maladies respiratoires, Friend, Thomson, Wilkie et Barnum (1977) démontrèrent que ces cas étaient dus à des infections mixtes entre virus et bactéries et plus particulièrement le virus PI-3 et P. haemolytica ou P. multocida. Smith, Frank et Gillette (1977) prouvèrent que le virus PI-3 et le HVB-1 étaient les principaux agents des maladies respiratoires bovines et Mohanty (1978) confirma que la fièvre de transport était due à l'action combinée du virus PI-3 et Pasteurella spp. Malgré l'existence d'une évidence expérimentale considérable sur son rôle dans la synergie virus-bactéries dans les maladies respiratoires bovines, le HVB-1 est beaucoup moins mentionné dans la littérature comme agent possible dans la pathologie respiratoire bovine que le virus PI-3. Une raison pour cela serait due au fait que le HVB₁ peut provoquer à lui seul des entités nosologiques distinctes. Une autre raison, serait que peu d'études ont été réalisées sur l'action combinée HVB₁-Pasteurella spp. que sur l'association PI-3-Pasteurella spp. (Yates, 1982 ; Jubb, Kennedy et Candpalmer., 1993 ; Lemaire, Meyer, Ernst, Vanherreweghe, Limbourg, Pastoret et Thiry, 1995 ; OIE, 2000). Néanmoins, Buxton et Fraser (1977) affirmèrent que le HVB-1 pourrait être un facteur initiateur dans la fièvre de transport.

Martin, Meek, Darvis, Thompson, Johnson, Lopez, Stephens, Curtis, Prescott, Rosendal, Savan, Zubeidy et Bolton. (1980), dans une étude épidémiologique, rapportèrent

qu'il y a une tendance d'isolement du HVB-1 et P. haemolytica ensemble plus fréquemment des poumons pneumoniques. Rothwell, Mills et Doige. (1979) isolèrent le HVB-1 chez 10 des 50 bovins morts mais ils ne précisent pas si la pneumonie était la cause de la mort. Il y a peu d'études sur d'autres associations virus-bactéries qui pourraient avoir une signification dans la pathologie respiratoire bovine (Thiry et Lemaire, 2003). Smith et al. (1977) suggérèrent que d'autres infections mixtes virus-bactéries étaient également possibles. Ils citèrent le BVD / MD, les adénovirus, les rhinovirus, le VRSB, les entérovirus, le virus de la stomatite pustuleuse bovine et le HVB-1.

Tous ces virus augmentent la pathogénicité de Pasteurella spp. dans les maladies respiratoires bovines. La même observation a été faite par plusieurs autres auteurs (Woldehiwet, Mamache et Rowan, 1990_(a); Abou El-Leil, 1992; Castrucci, Traldi et Tartaglione, 1992).

Thomas, Stott, Jones, Jebbett et Collins (1980) décrivent une épizootie de maladie respiratoire des veaux dans laquelle le VRSB et P. haemolytica ont été isolés. Les infections respiratoires bovines à VRSB sont généralement associées à des infections bactériennes secondaires (Bryson et al., 1979; Thomas et al., 1980; Pirie, Petri, Pringle, Allan et Kennedy, 1981; Van Den Ingh, Verhoeff et Van Nieuwstadt, 1982; Verhoeff, Van Der Ban et Nieuwstadt, 1984; Selim, El-Shaheed, Zaki, El-Arrash et Abaza, 1998; Sayed et Ali, 2001). Baker, Werdin, Ames, Markham et Larson (1986) étudièrent 14 foyers de pneumonie chez des veaux de race laitière dans lesquels le VRSB était le virus le plus fréquemment identifié soit par isolement soit par examen des écouvillons nasaux par la technique d'immunofluorescence. P. multocida, P. haemolytica et Mycoplasma spp. étaient isolés dans 12, 4 et tous les 14 foyers de pneumonie respectivement. Des observations identiques ont été faites par d'autres auteurs (Verhoeff et Van Nieuwstadt, 1984; Kimman, Zimmer et Marsh, 1988; Van Der Poel et al., 1993).

1.1.4. Mycoplasmes :

Au moins 20 espèces de Mycoplasmes ont été isolées chez les bovins. Il s'agit de M. bovirhinis, M. dispar, M. mycoides var. mycoides, M. alkalescens, M. arginini, M. bovis, M. bovigentialium, Acholeplasma laidlawii, A. modicum, A. axantbum, Ureaplasma spp., groupe 7 de Leach, M. gallinarum, M. gatea, M. bovoculi, M. verecundum, M. canadense, M. alvi et deux Anaeroplasma spp.

Les douze premières espèces ont été isolées du tractus respiratoire des bovins (Ernø, 1978 ; Woldehiwet, Mamache et Rowan, 1990_(b) ; Nakaya, Tomita, Ikenchi et Torikai, 1998 ; Selim et al., 1998 ; Tegtmeire, Friis, Jensen et Jensen, 1999).

Gourlay, Mackenzie et Cooper . (1970) rapportèrent l'isolement de mycoplasmes dans 75% de 65 poumons pneumoniques dans le sud ouest de l'Angleterre. Ureaplasma spp. ont été isolés dans 58%, M. dispar de 51% et M. bovirhinis de 23% des poumons.

M. bovirhinis a été isolé pour la première fois par Harbourne, Hunter et Leach en 1965, en Angleterre et l'a été également dans plusieurs pays ensuite. Ureaplasma spp. ont été également isolés de poumons pneumoniques en Angleterre (Gourlay, 1968 ; Gourlay et al., 1970 ; Woldehiwet et al., 1990 ; Welsh, 1993), au Canada (Ruhnkle et Van Dreumel, 1972 ; Van Donkersgoed, Ribble et Boyer, 1993), aux U.S.A. (Livingston, 1972), en Ecosse (Pirie et Allan, 1975) au Danemark (Bitsch, Friis et Krogh, 1976), en France (Poumarat, Perrin et Martel, 1986 ; Espinasse, Levrier, Alzien, Papa georgiou, Beguin et Van Gool, 1988).

Mycoplasma dispar a été isolé pour la première fois en Angleterre de poumons pneumoniques de veaux (Gourlay et Leach, 1970). D'autres isolements de M. dispar ont été effectués sur des poumons pneumoniques en Angleterre (Gourlay et al., 1970, Woldehiwet et al., 1990), en Australie (St George, Horsfall et Sullivan, 1973) ; aux U.S.A (Ose et Muenster, 1975), en Ecosse (Pirie et Allan, 1975), au Danemark (Bitsch et al., 1975).

M. bovirhinis après avoir été isolé par Harbourne, Hunter et Leach (1965) n'a été nommé qu'en 1967 par Leach (1967). Des isolements continus de ce mycoplasme furent réalisés aux U.S.A (Hamdy et Trapp, 1967), en Hollande (Cottew et Leach, 1969), en Italie (Rinaldi, Leach, Cervio, Mandelli et Redaelli, 1969) au Danemark (Bitsch et al., 1976) en Tchécoslovaquie (Jurmanova et Krejei, 1971) et en Australie (Cottew, 1970). Des isolements de M. bovirhinis et d'Ureaplasma spp. ont été réalisés sur des poumons non-pneumoniques de bovins (Gourlay et Thomas, 1970 ; Thomas et Smith, 1972 ; Woldehiwet et al., 1990 ; Baudet et al., 1994).

M. bovis a été incriminé dans les maladies respiratoires durant les trois dernières décennies. Il a été isolé de la cavité nasale d'une vache avec une maladie respiratoire (Kehoe, Norcross, Carmichael et Standberg, 1967) et de poumons pneumoniques de taurillons à l'engrais (Dellinger et Jasper, 1972). M. bovis a été également isolé en Grande Bretagne dans plusieurs épizooties de pneumonie de veaux en élevage intensif (Thomas, Howard et Gourlay, 1975), au Canada (Langford, 1977), en Italie (Pignatelli, 1978) ,aux U.S.A (Stalheim, 1976), et en France (Baudet et al., 1994).

Il faut souligner que Mycoplasma spp. et Ureaplasma spp. ont été isolés de foyers de maladies respiratoires et en association avec des bactéries et/ou des virus. Donc, à l'exception de M. dispar qui peut être considéré comme agent pathogène primaire pour le tractus respiratoire (Howard, Gourlay, Thomas et Stott, 1976, Gourlay et Howard, 1978), le rôle des autres mycoplasmes en pathologie respiratoire demeure encore incertain.

2. Infections expérimentales :

2.1. Bactéries :

Plusieurs chercheurs ont tenté de reproduire expérimentalement une maladie respiratoire en utilisant P. haemolytica et/ou P. multocida inoculés par diverses voies, et avec des degrés variables de succès. Par exemple, Carter (1954) échoua de provoquer une maladie respiratoire par inoculation d'une suspension obtenue de bovins naturellement affectés par la fièvre de transport et inoculés par voie intra-nasale et intra-trachéale. D'autres essais ont été réalisés tels que ceux par Hoerlein et Marsh (1957) avec des résultats similaires. Dans ce cas, les veaux ont été inoculés par voies intraveineuse, sous-cutanée et intra-nasale avec du sang et de l'exsudat nasal de cas naturels de maladie. D'autres essais utilisant P. haemolytica et/ou P. multocida étaient non-concluants (Heddleston et al., 1962 ; Hamdy, Trapp, Gale et King, 1963 ; Saunders et Berman, 1964).

Omar (1966) cita une communication personnelle de Darbyshire et Lamont comme une évidence que l'inoculation, de veaux privés de colostrum, par P. haemolytica n'entraîna aucun signe clinique et aucune lésion à l'autopsie. Plusieurs études ont décrit des succès dans la production expérimentale d'une maladie respiratoire par inoculation d'un nombre élevé de Pasteurella spp. directement dans la trachée, une situation peu probable dans les conditions naturelles. Des études très raffinées sur le mode d'action de P. haemolytica ont montré la possibilité de produire une maladie expérimentale par inoculation de P. haemolytica A₁ (Whiteley et al., 1990 ; Slocombe et al., 1990 ; Mc Bride, Costvet et Paulsen, 1992). Certaines de ces études ont utilisé des nombres très élevés de bactéries (Friend, Thomson et Wilkie, 1977), d'autres auteurs ont inoculé des veaux à des intervalles très courts (Gibbs, Allan, Selman et Wiseman, 1983). Carter (1956) inocula des veaux avec P. haemolytica par voie intranasale, intraveineuse et intratrachéale et provoqua une pneumonie qui varie en sévérité de nulle à très sévère. Collier, Chaw, Benjamin et Deem (1960) exposèrent quatre veaux à un aérosol de P. haemolytica ; trois veaux exprimèrent des signes cliniques d'une maladie respiratoire.

Baldwin, Marshall et Wessman (1967) inoculèrent deux veaux par voie intratrachéale avec P. haemolytica. Un des deux veaux présente des signes modérés de maladie respiratoire alors que l'autre reste normal. Collier (1968) provoqua une pneumonie fibrineuse et une pleurésie chez des veaux âgés de un mois et inoculés par voie hypodermique. L'inoculum consista en une suspension concentrée de 1 à 2 ml de P. haemolytica et inoculée près du ganglion lymphatique préscapulaire. Collier (1976) trouva que les bovins soumis à un long transport et exposés au froid après inoculation intra-trachéale de P. haemolytica développèrent des lésions identiques à celles observées dans les cas naturels de pneumonie pasteurellique.

Les mêmes résultats ont été obtenus par d'autres auteurs utilisant P. haemolytica ou P. multocida inoculé dans la trachée ou directement dans les poumons de veaux (Panciera, Corstvet, Walker et Wrack, 1976 ; Friend, Thomson, Wilkie et Barnum, 1977 ; Friend, Thomson et Wilkie, 1977 ; Corstvet, Panciera et Newman, 1978 ; Wilkie, Markham et Shewen, 1980).

En résumé, des signes cliniques et des lésions similaires à ceux observés dans les cas naturels de pneumonie pasteurellique ont été produits expérimentalement en utilisant P. haemolytica et/ou P. multocida mais les doses et les voies d'inoculation utilisées expérimentalement ne semblent pas représenter celles survenant dans les conditions naturelles.

Il y a peu de doute que Pasteurella spp. sont responsables du dommage final du tractus respiratoire mais il est incertain si ces pathogènes sont capables de causer des maladies respiratoires sans le concours d'autres micro-organismes (Yates, 1982 ; Confer et al., 1990 ; Weiss, Bauer et Whiteley, 1991 ; Baudet et al., 1994 ; Highlander, 1997).

2.2. Virus :

Les virus ont été considérés comme agents primaires des maladies respiratoires bovines depuis que Lamont et Kerr (1939) démontrèrent qu'une maladie respiratoire peut être reproduite par inoculation de veaux à l'aide d'un filtrat dépourvu de cellules et provenant de poumons malades. Baker (1943) récupéra un agent filtrable à partir d'extrait de poumons de veaux pneumoniques. Des veaux sains inoculés avec ce filtrat, après passage sur des souris, développèrent une pneumonie similaire à celle des veaux à partir desquels le filtrat a été prélevé. Depuis, un nombre de virus ont été isolés de veaux atteints de maladie respiratoire et certains parmi eux sont considérés comme agents importants dans l'apparition de maladies respiratoires (Philip et Darbyshire, 1971). Ces virus sont le HVB-1 (Schroeder et Moys,

1954 ; Darbyshire, Dawson, Paterson et Loosmore, 1962), PI-3 (Reisinger et al., 1959), les adénovirus (Klein, Earley et Zellat, 1959 ; Darbyshire, 1968), les réovirus (Rosen et Abinati, 1960), les rhinovirus (Bögel et Bohm, 1962), les entérovirus (Moll et Davis, 1959) et le VRSB (Paccaud et Jacquier, 1970 ; Inaba, Kono, Omori et Matumoto., 1972 ; Rossi et Keisel, 1974 ; Stott et al., 1980).

Par la suite, un grand nombre d'études expérimentales ont été réalisées utilisant différents virus tels que le PI-3, le VRSB, le BVD/MD, le HVB-1, afin d'étudier leur rôle étiologique dans les maladies respiratoires bovines (Brownlie, 1991 ; Schroeder et Keil, 1999).

2.2.1. Le Virus parainfluenza type-3 (PI-3) :

Nombreux sont les chercheurs qui ont tenté de produire une pneumonie chez les veaux en utilisant le virus PI-3 mais sans grands succès (Boyd, 1961 ; Inaba, Kono, Omori et Matumoto, 1965 ; Dawson, Darbyshire et Lamont, 1965, Jubb et al., 1993 ; Bellini, Rota et Anderson, 1998 ; Radostits, Gay, Blood et Hintchcliff, 2000). Dawson et al. (1965) inoculèrent six veaux privés de colostrum avec PI-3 par voies intra-nasale et intra-trachéale. Ce virus a été isolé chez quatre veaux qui ont présenté une pyrexie, des signes modérés et des réponses sérologiques. Les lésions observées à l'autopsie sont similaires à celles décrites par Jarrett (1954) sur des poumons de veaux dans des foyers naturels de maladies respiratoires. D'autres auteurs obtiennent les mêmes résultats en utilisant des veaux obtenus par hystérectomie, ou privés de colostrum, ou Specific-Pathogen Free (SPF) et inoculés par voie intra-nasale, intra-trachéale ou exposés à un aérosol contenant le virus PI-3 (Betts, Jennings, Omar, Page, Spencer et Walker, 1964 ; Omar, Jennings et Betts, 1966 ; Son Tsai et Thomson, 1975 ; Jericho, Darell et Langford, 1982 ; Bellini et al., 1998). De même, Thomas, Stott, Collins, Jebett et Stark (1977) ; et Jericho et al. (1982) inoculèrent des veaux par voie intranasale en une seule dose, alors que Stott et al. (1978) utilisant un virus après un seul passage en série et Carriere, Maxie, Wilkie, Savan, Valli et Johnson (1983) utilisant une inoculation du virus PI-3 et de P. haemolytica séparée ou associée. Ils ont noté que les veaux inoculés avec le virus PI-3 seul ne présentaient pas des signes cliniques graves quoiqu'une séroconversion au virus PI-3 ait été observée et que le virus ait été isolé des naso-pharynx à des titres très élevés.

2.2.2. Le Virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) :

Une série d'études épidémiologiques au début des années 1960 ont établi que le VRS était responsable des bronchiolites et des pneumonies des enfants beaucoup plus qu'un autre agent infectieux surtout durant la première année de la vie de l'enfant (Beem, Wright, Humbre, Egerer et Oehme, 1960 ; Chanock et Parrot, 1965). Le VRS humain est regardé actuellement comme la principale cause d'hospitalisation des enfants durant la première année de la vie de l'enfant en Europe et en Amérique du Nord (Stott et Taylor, 1985).

En 1968, Dagget, Taylor-Robinson et Gallop révélèrent des anticorps anti-VRSB dans le sérum de bovins et suggérèrent que le VRSB infectait fréquemment les bovins. Par la suite, le VRSB a été isolé d'épizooties de maladies respiratoires bovines chez les veaux (Bryson et al., 1978 a, b ; Bryson et al., 1979 ; Pirie et al., 1981 ; Kimman et al., 1988 ; Van Der Poel et al., 1993 ; De Jong et al., 1996).

Néanmoins, la majorité des infections expérimentales avec le VRSB ne semblent provoquer que des signes cliniques modérés et des lésions pathologiques mineures dans l'appareil respiratoire profond. Paccaud et Jacquier (1970) inoculèrent des veaux gnotobiotiques en élevage conventionnel provoquant ainsi une fièvre, une rhinite bilatérale sévère, une toux non productive mais persistante pendant deux jours après inoculation. Jacobs et Edington (1975) inoculèrent, par voie intranasale, des veaux gnotobiotiques et des veaux privés de colostrum en élevage conventionnel avec trois souches de VRS d'origine bovine et une souche de VRS d'origine humaine. Chaque souche provoqua une pyrexie biphasique et un jetage nasal séreux. Les souches virales ont été retrouvées dans les sécrétions nasales, 4 à 10 jours après inoculation, dans les muqueuses nasale, trachéale et bronchiale et dans les poumons des veaux abattus 7 à 13 jours après inoculation. Ces infections n'ont pas induit des lésions mais l'examen histologique révéla une rhinite dégénérative focale et une bronchiolite catarrhale avec quelques formations de syncytia dans les bronchioles et les alvéoles.

Mohanty, Ingling et Lillie (1975, 1976) rapportèrent que les veaux infectés expérimentalement avec le VRSB développèrent une pyrexie transitoire et des signes respiratoires modérés. Les modifications histopathologiques étaient celles d'une pneumonie et la formation de cellules géantes dans la lumière alvéolaire. Certains des veaux présentaient une réponse sérologique alors que d'autres non. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des agneaux privés de colostrum (Lehmkuhl et Cutlipp, 1979). Au contraire, Bryson, Mc Nulty, Logan et Bush (1983) produisèrent une maladie respiratoire grave en inoculant des veaux par voies nasale et intrachéale simultanément. La toux et la tachypnée étaient les signes prédominants. Pour étudier les lésions pathologiques provoquées par le virus, les veaux étaient nécropsiés à différents jours après inoculation.

Une consolidation pulmonaire fut observée chez les veaux nécropsiés entre le 4^{ème} et le 13^{ème} jours après inoculation. Des syncytia, dont plusieurs contenaient des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles, ont été observés dans les parois bronchiolaires et alvéolaires 4, 5 et 6 jours après inoculation. Plusieurs autres lésions ont été décrites. Elles comprenaient de la nécrose, une métaplasie de l'épithélium des bronches et des bronchioles, l'occlusion des voies respiratoires, un épaississement des septa interalvéolaires et alvéolaires et un collapsus des alvéoles. Des résultats similaires ont été obtenus par Castleman, Lay, Dubovi et Slauson (1985) utilisant les mêmes voies d'inoculation (Pastoret et al., 1988 ; Lekeux, 1988, Van Der Poel et al., 1993 ; De Jong et al., 1996).

2.2.3. Le Virus de la diarrhée à virus-maladie des muqueuses BVD/MD :

La pneumo-entérite est considérée comme le risque majeur pour la santé des veaux (Roy, 1980). Le virus BVD/MD est un pathogène majeur des bovins et contribue à la genèse d'une grande variété de pathologies allant de l'infection inapparente à un syndrome fatal de maladie des muqueuses (Browline, 1991).

Le virus BVD/MD appartient au genre des Pestivirus de la famille de Flaviviridae. Deux souches cytopathogène et non-cytopathogène de BVD/MD peuvent être isolées chez les animaux infectés de manière persistante et souffrant de la maladie des muqueuses (Schweizer et Peterhans, 1999).

Les bovins infectés par le virus BVD/MD peuvent présenter une variété de signes cliniques tant entériques que respiratoires. Cette variété était à l'origine de la description de deux entités nosologiques séparées, la diarrhée à virus et la maladie des muqueuses (Brownlie, 1985). Il a été proposé que la maladie des muqueuses se développait après une infection in utero par un virus BVD/MD non-cytopathogène résultant en la naissance d'un veau avec une virémie persistante. Si ce veau s'infecte par la suite par un virus cytopathogène, la maladie des muqueuses apparaît et seulement les animaux qui sont infectés de manière persistante par un virus non-cytopathogène qui présentent la maladie des muqueuses. Par contre, si les veaux n'ont pas été infectés in utero et exposés à une souche cytopathogène du virus BVD/MD ils développèrent une maladie fébrile bénigne avec des symptômes respiratoires et digestifs suivis d'une guérison et d'immunité (Kahrs, Atkinson, Baker, Carmichael, Loggins, Robson et Sheffy, 1964 ; Martig, Bass, Nicolet et Steck, 1976 ; Baker, 1987 ; Gunder, 1990 ; Fray, Supple, Morrison et Charleston, 2000).

L'infection expérimentale du veau par le virus BVD/MD a entraîné l'apparition des symptômes modérés (Malmquist, 1968 ; Mebus, Newman et Stair, 1975 ; Omran, 1991 ;

Weiss, Hertig, Strasser, Vogt et Peterbans, 1994). Dans la majorité des études expérimentales, les seules trouvailles constantes sont la pyrexie et la leucopénie. Néanmoins, une multitude de signes cliniques tels que la fièvre, une toux sèche non productive, des érosions du museau, de la diarrhée et la fourbure ont été décrites (Nettleton, Barlow, Gardiner, Pastoret et Thiry, 1985). Des cas de mortalités ont été rarement observés chez des veaux infectés expérimentalement par le virus BVD/MD. David, Cunning, Crawshaw, Hibberd, Lloyd et Marsh (1993) rapportèrent des cas de mortalité de bovins adultes par suite d'une infection par le virus BVD/MD.

Corapi, French et Dubovi (1989) ont révélé des mortalités dues à une thrombocytopenie sévère chez des veaux infectés expérimentalement par une souche non-cytopathogène du virus BVD/MD. Nuttal, Stott et Thomas (1980) inoculèrent des veaux avec des souches cytopathogènes et non-cytopathogènes du virus BVD par voie intranasale, mais n'observèrent pas de lésions orales ni de diarrhée. Wray et Roeder (1987) provoquèrent une diarrhée sévère après inoculation des veaux par voie intra-nasale avec une souche du virus BVD/MD. En Egypte, Ali, Shehab et Abdel-Rahim (2002) rapportèrent des cas de mortalité chez des veaux importés dans trois provinces de basse Egypte et chez lesquels les virus BVD/MD, le PI-3 et le HVB-1 ont été isolés. Les études de laboratoire ont révélé que la principale cause de mortalité était le BVD/MD seul ou en association avec les virus PI-3 ou le HVB-1. Expérimentalement, ce virus BVD/MD s'est révélé fatal à plusieurs veaux (60% des cas) de l'expérience.

2.3. Infections mixtes bactéries - virus :

Les observations faites sur les pandémies de grippe humaine dès les 19^{ème} et 20^{ème} siècles supposèrent la possibilité d'une synergie entre des virus et des bactéries dans la pathogénèse des maladies infectieuses de l'appareil respiratoire. Les essais de démonstration de cette synergie ont été basés sur les infections expérimentales d'animaux de laboratoire, en particulier des souris et les résultats obtenus ont été extrapolés aux humains et aux grands animaux (Jakab, 1982).

Des études sur l'interaction entre le virus de la grippe et des bactéries dans les poumons de souris ont démontré que :

- * les infections bactériennes ne peuvent pas s'établir en l'absence d'infections virales,
- * les infections mixtes provoquent de la pneumonie avec une morbidité et une mortalité significativement plus élevées que dans le cas d'infection avec un seul agent,

* les effets synergiques sont observés, uniquement, chez les animaux infectés par les virus avant les infections bactériennes (Jakab, 1982).

Chez l'homme, les infections par les virus respiratoires tels que le virus de la grippe sont généralement suivies par des invasions par Staphylococcus spp., Haemophilus spp. et Streptococcus spp. (Jakab, 1982). Ces espèces bactériennes existent généralement comme commensales dans l'appareil respiratoire supérieur (naso-pharynx et sinus) sans qu'elles puissent, à elles seules, provoquer une pathologie apparente.

Chez les bovins, on a supposé depuis plusieurs années qu'une synergie existe entre les virus et Pasteurella spp. et joue un rôle important dans la pathogénèse des maladies respiratoires bovines.

Collier (1968) suggéra qu'une combinaison du virus PI-3 et Pasteurella spp. était le facteur étiologique dans la fièvre de transport dans sa forme la plus fréquente. Rosner (1971), à partir d'études expérimentales et sérologiques, conclut qu'il y a un rapport entre le virus PI-3 et Pasteurella spp. dans la pathogénèse des maladies respiratoires bovines. Néanmoins, Thomson (1974) trouva peu d'évidence, à partir d'examen pathologiques et microbiologiques de cas naturels de maladies respiratoires, pour appuyer cette conclusion. Plusieurs auteurs ont réalisé des études expérimentales pour expliquer le phénomène de synergie, en utilisant diverses doses, voies d'administration, divers temps d'exposition à des virus et à des bactéries et des animaux avec des statuts microbiologiques différents (Yates, 1982 ; Baroux, 1991 ; Frank et al., 1993).

Heddleston et al. (1962) étudièrent huit veaux ayant reçu le virus PI-3 en aérosol, par voies intra-nasale et intra-trachéale suivie 1 ou 8 jours après par l'inoculation de P. haemolytica, P. multocida ou les deux et donnés par les mêmes voies d'administration. L'autopsie n'a pas été réalisée mais les auteurs ont jugé que les veaux ayant reçu le virus PI-3 et P. multocida espacés de 8 jours étaient les moins affectés cliniquement, et ceux ayant reçu le virus PI-3 et P. multocida espacés d'un jour étaient les plus sérieusement affectés cliniquement.

Hamdy et al. (1963) inoculèrent 12 veaux par voies intra-trachéale et intra-nasale avec le virus PI-3, suivie d'une inoculation, 4 à 6 heures après, d'une mixture de P. multocida et de P. haemolytica, donnée par la même voie. Ces veaux présentèrent des signes de dépression, d'anorexie, de fièvre et de toux. A l'autopsie, 9 veaux avaient des lésions de pneumonie similaires à celles observées dans les cas naturels de fièvre de transport. Jericho (1979) démontra que la synergie entre l'exposition au virus PI-3 et P. haemolytica était dépendante de l'intervalle qui sépare l'inoculation des deux germes.

Un intervalle de trois jours entre l'exposition au virus et la bactérie était nécessaire. Cette synergie provoqua une pneumonie purulente mais aucune maladie respiratoire purulente n'a été observée au niveau de l'appareil respiratoire supérieur. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs (Frank et al., 1986 ; Bellini et al., 1998 ; Radostits et al., 2000). Collier et al. (1960) exposèrent des groupes de veaux au HVB-1 par voie intratrachéale et 3 jours plus tard à un aérosol de P.haemolytica. Une maladie respiratoire se déclara dans les groupes exposés au HVB-1 seul, à P.haemolytica seul et aux deux germes en association. Néanmoins, les signes cliniques étaient plus sévères et plus durables dans le groupe ayant reçu l'infection mixte. Ces auteurs conclurent le HVB-1 contribue à la gravité de l'infection des bovins par P.haemolytica. Jericho, Magwood et Stockdale (1976) rapportèrent l'exposition de cinq veaux au HVB-1 suivie 4 jours après par l'inoculation de P.haemolytica à des veaux stressés socialement, nutritionnellement et climatiquement. Ceci produit de la fièvre 3 jours après l'exposition à la bactérie et deux veaux devenaient malades. A l'autopsie, 4 veaux ont présenté une pneumonie lobaire et deux avaient une pleurésie fibrineuse sévère et un épanchement thoracique de couleur jaune ambré.

Jakab (1982) suggéra que les infections virales du tractus respiratoire entraînent une destruction cellulaire et favorisent des infections bactériennes secondaires par :

- une diminution de la clearance des bactéries dans « l'escalator mucociliaire » dont l'efficacité est anéantie par une modification de la consistance du mucus et de l'activité ciliaire sous l'action virale,
- une réduction de l'élimination biologique des bactéries par phagocytose
- l'augmentation de l'opportunité pour la bactérie de se multiplier dans l'exsudat des lésions induites par le virus.

Les infections virales, le transport, les températures extrêmes conduisent à la prolifération de P.haemolytica, de H.somnus et de Mycoplasma spp. Ces facteurs inhibent les mécanismes de défense ou entraînent des lésions pulmonaires (Whiteley et al., 1992 ; Grotelteschen, 1995). La réduction de la phagocytose des bactéries est liée aux infections virales qui induisent une diminution de la réponse chimiotactique, une diminution de la migration des macrophages alvéolaires et une diminution de la production de surfactant par les pneumocytes type-2 alvéolaires. Le surfactant joue un rôle capital dans la phagocytose par les macrophages alvéolaires et dans la prévention de l'atelectasie. Cette dernière entraîne un collapsus du tissu pulmonaire et une hypoxie qui anéantit le métabolisme des macrophages. Dans le tractus respiratoire, les effets des infections virales sur le développement des infections bactériennes secondaires dépendent de la dose de virus, de l'intervalle séparant les

infections virales et bactériennes, l'existence d'autres infections intercurrentes, des facteurs de l'environnement tels que la température et l'humidité relative, des facteurs liés à l'hôte tels que l'immunité, la prédisposition génétique, le statut individuel et nutritionnel (Adams et Garry, 1993 ; Garry et Adams, 1996 ; Soll, Horbar et Lucey, 1996).

3. Les facteurs d'environnement :

3.1. Introduction :

Le terme environnement comprend toutes les conditions ambiantes qui influencent la santé, le développement et le bien-être général d'un animal. Ces conditions peuvent être divisées en trois catégories :

- Climatiques
- Physiques (structurelles)
- Sociales (comportementales)

La température ambiante, l'humidité relative, les mouvements de l'air, l'aération, les précipitations, la poussière, la pression de l'air, la lumière, le son et les autres vibrations et la gravité sont parmi les facteurs qui constituent les environnements climatiques et physiques (Mitchell, 1975).

Plusieurs études épidémiologiques des maladies respiratoires ont montré que les conditions climatiques peuvent influencer la pathogénèse et la sévérité des maladies respiratoires. Néanmoins, la majorité de ces études était basée sur des observations de cas cliniques naturels et non sur des études expérimentales dans des conditions d'environnement contrôlé (Dennis, 1986). Webster (1970) donna des exemples de maladies respiratoires dans lesquelles des facteurs météorologiques ont été incriminés dans la diminution de la résistance de l'hôte et l'apparition des signes cliniques de maladies chez les animaux de ferme. Il cita la fièvre de transport, la pneumonie enzootique, le nez rouge (IBR), la diarrhée et la septicémie des bovins.

Appleman et Owen (1971) proposèrent que les causes de la pneumonie étaient, probablement, des combinaisons d'infections virales et bactériennes aggravées par des facteurs de l'environnement. Des effets saisonniers tels que des conditions chaudes et sèches en été et froides, humides et ventées en hiver, ont été associées avec une augmentation de la mortalité des veaux (Leech, Macrae et Menzies, 1968 ; Martin, Schwab et Franti, 1975).

Webster (1981), malgré une évidence expérimentale limitée n'avait aucun doute que les changements climatiques rapides peuvent affecter l'aptitude de certains micro-organismes

à coloniser l'organisme bovin pour des raisons qui concernent la survie du pathogène et la résistance de l'hôte à la fois.

Webster (1970) suggéra que l'environnement extérieur pourrait avoir un effet sur la résistance locale dans l'un des deux sens :

- Des facteurs tels que la température et l'humidité relative pourraient exercer un effet sur quelques parties de l'organisme telles que la peau et les muqueuses de l'appareil respiratoire qui sont en contact direct avec l'environnement extérieur et donc facilitent la pénétration des micro-organismes pathogènes.
- Les facteurs environnementaux tels que le froid et la chaleur peuvent affecter la résistance générale de l'animal par diminution des synthèses physiologiques de contrôle et les mécanismes métaboliques qui sont concernés directement par la synthèse et la libération d'agents spécifiques et non spécifiques entrant dans la réponse systémique de l'organisme aux infections. Ces effets négatifs sur la réponse de l'organisme aux infections sont désignés collectivement sous le terme de stress.

Harkness (1977) suggéra que le climat et l'hygiène de l'air, par exemple, sa concentration en ammoniacque et en bactéries dans les boxes de veaux, sont très importants dans l'apparition de la pneumonie enzootique des veaux. Néanmoins, les effets de la température, de l'humidité relative et de l'ammoniacque ne sont pas complètement élucidés. Bourne (1975) insista sur l'importance du contrôle des facteurs de l'environnement qui ont un effet négatif sur le fonctionnement de l'appareil ciliaire du tractus respiratoire. Il cita entre autres, la température, l'humidité relative et l'ammoniacque.

Saunders et Barman (1964) ont essayé de démontrer, sans succès, le rôle des facteurs de l'environnement dans l'épidémiologie de la pneumonie en stressant des veaux par du froid et de la fatigue avant l'inoculation expérimentale avec le virus PI-3. Ces auteurs étaient incapables d'induire l'infection des veaux en les transportant par camion pendant six heures par temps froid après leur exposition à P.multocida type D ou P.haemolytica. Des conclusions identiques ont été obtenues par d'autres auteurs (Kaneene et Hurd, 1990 ; Sargeant, Blackwell et Martin, 1994).

Les deux principaux facteurs d'environnement qui ont été traités dans cette revue de la littérature sont la température et l'humidité relative à partir d'observations faites sur le terrain. Plusieurs enquêtes épidémiologiques sur des maladies respiratoires des bovins ont démontré l'existence d'une corrélation entre l'incidence des maladies respiratoires et certaines combinaisons de température et d'humidité relative ou des changements de ces deux

paramètres. Barr, Mc Millan, Jennings et Kelley (1951) rapportèrent que la majorité des cas de pneumonie enzootique apparaissent entre la fin de l'hiver et le début du printemps quand des changements de température et d'humidité relative sont plus fréquents. Parker (1965) observa que la sévérité des foyers des maladies respiratoires chez des veaux élevés dans des étables était liée à des humidités élevées créées par une ventilation déficiente en hiver. Germain, Redon et Tournut (1975) trouvèrent que les anticorps antiviral PI-3 étaient plus prévalents en hiver qu'en été et que les infections au virus PI-3 étaient plus fréquentes sous un climat froid et humide. Les mêmes auteurs suggérèrent qu'un climat froid, humide, lourd et venté favorise la dissémination du virus PI-3.

Blood, Radostits et Henderson (1983) établirent que la pneumonie enzootique des veaux et des porcs et la morve des chevaux étaient associées avec un climat froid et humide qui résulte d'un élevage inadéquat donc ces deux maladies tendent à être des maladies hivernales. Blood et al. (1983) proposa que l'IBR est une maladie qui apparaît principalement en hiver, mais Webster (1970) rapporta qu'au Canada son incidence était plus grande en été. Martin, Schwab et Franti (1975) trouvèrent qu'il y avait des corrélations entre les conditions météorologiques et la mortalité des veaux en Californie et que le maximum de mortalité était enregistré d'octobre à janvier et directement associé avec des conditions froides, humides et ventées.

Bryson et al. (1978) suggéra que l'apparition et la sévérité des maladies respiratoires étaient plus importantes chez les veaux élevés dans des étables à ventilation naturelle que chez ceux élevés dans des étables à ventilation mécanique.

Ces observations étaient associées avec des changements dans les conditions climatiques. Ces auteurs suggérèrent que le surpeuplement et le manque de désinfection sont aussi des facteurs qui augmentent l'incidence des maladies respiratoires des veaux. Sischo et Hird (1990) trouvèrent que la sensibilité des veaux aux maladies respiratoires était dépendante de l'âge et était la plus élevée entre 6 et 8 semaines d'âge. Ceci a été attribué à des concentrations basses d'anticorps d'origine maternelle à cet âge. Thomas (1978) réalisa une enquête sur l'épidémiologie des maladies respiratoires pendant sept ans dans le sud-ouest de l'Angleterre et démontra que l'incidence de la pneumonie enzootique était plus grande au début et à la fin de l'hiver et lorsque les veaux étaient âgés de 3 à 4 mois. Webster (1981) suggéra que les conditions froides et humides du printemps et l'automne et les variations quotidiennes qui surviennent en ces périodes prédisposèrent aux maladies respiratoires beaucoup plus qu'un froid sévère (Curtis, Erb et White, 1988 ; Woldehiwet et al., 1990_a, Sivula, Ames et Marsh, 1996). Miller, Harkness, Richards et Pritchard (1980) échouèrent de

trouver un rapport entre l'apparition des maladies respiratoires et le climat, en étudiant des données des stations météorologiques locales. Néanmoins, ils conclurent que les données météorologiques ne reflétaient pas le micro-climat des étables des veaux. Dans une enquête sur 10 unités d'élevage de taurillons, Mc Farlane (1966) trouva que la mortalité due aux maladies respiratoires était basse lorsque les écarts entre la température et l'humidité relative à l'intérieur et à l'extérieur des étables étaient faibles. Ceci suppose que la ventilation serait beaucoup plus importante que la température et l'humidité relative.

Dans une enquête sur les effets de la conception des étables des veaux sur la mortalité, Van Donkersgoed et al. (1993) rapportèrent que 0,7% seulement des veaux âgés de 12 semaines mourraient d'une pneumonie virale dans une étable à ventilation adéquate contre 7% dans celle à ventilation inadéquate. Webster (1981) ; Dejong, Diekmann et Heesterbeek (1995) suggérèrent qu'il serait improbable que l'incidence des maladies respiratoires en hiver soit due au froid seul mais plutôt à une augmentation progressive de la charge infectieuse d'une étable durant l'hiver, à cause d'un repeuplement continu par des veaux sensibles.

Chapitre II : Diarrhées néonatales des veaux

1.Introduction

Les diarrhées néo-natales représentent une source majeure des pertes économiques des élevages bovins et la cause première de la mortalité néo-natale dans la plupart des pays (Radostits, Gay, Blood et Hinchcliff, 2001).

Leurs causes sont très variées. Une simple modification alimentaire, un stress (allaitement) peuvent provoquer l'apparition de la diarrhée.

Parallèlement des virus, des bactéries ou des parasites peuvent en être responsables.

Des mesures préventives permettent d'abaisser sensiblement la morbidité et la mortalité (nutrition équilibrée des mères et vaccination adaptées, hygiène de vêlage, distribution optimale de colostrum), toutefois, lorsque la diarrhée est déclarée et que les pertes hydriques et minérales sont importantes, la réhydratation constitue l'un des moyens les plus efficaces pour lutter contre le syndrome diarrhéique.

L'objet de ce travail est de faire une étude comparative de la colonisation intestinale des veaux par des colibacilles et l'étude de leur pathogénicité, ainsi que le rôle du Rotavirus dans le déclenchement de la diarrhée et la sévérité des symptômes diarrhéiques chez des veaux âgés de moins de un mois. Une étude systématique des différents agents pathogènes des diarrhées néo-natales et de leur pathogénie pour aboutir au déclenchement de la diarrhée et ses conséquences sur l'organisme est abordée dans cette revue de la littérature.

2. Physiopathologie des diarrhées néo-natales

2.1 Les agents de la diarrhée néo-natale et leur pathogénie :

On distingue habituellement plusieurs types de diarrhées néo-natales :

- Les diarrhées nutritionnelles sont dues (Bywater, 1975 ; Radostits et al., 2001) soit :
 - à l'ingestion de quantités excessives d'aliments ;
 - à l'ingestion d'aliments d'allaitement de mauvaise qualité (Griess, 1980 ; Roy, 1988) ou mal préparés ou mal distribués et qui sont mal digérés ;
 - à une perturbation du transit digestif ;
 - à des troubles de la digestion (déficiences enzymatiques) ou de l'absorption.

Ces diarrhées d'origine alimentaire sont souvent bénignes mais lorsqu'elles deviennent graves, elles peuvent favoriser l'installation des diarrhées d'origine infectieuse.

- Les diarrhées infectieuses de différentes origines ; les agents pathogènes pouvant être des parasites, des virus ou des bactéries.

Ils agissent seuls ou en association (Morin, Larivière et Lallier, 1976). En effet, sur un même veau coexistent souvent deux agents infectieux ou plus. Dans une même exploitation, il est souvent possible de mettre en évidence successivement plusieurs agents pathogènes différents. Les facteurs infectieux sont classiquement considérés comme déterminants. Le nombre de ces agents impliqués dans les gastro-entérites néo-natales du veau (GEDV) est très élevé (environ une vingtaine).

Que se soit un virus, une bactérie ou un parasite, tous se localisent à l'intestin et exercent leur effet pathogène in situ. Ils peuvent être responsables de diarrhées très graves qui, en cas de non traitement, peuvent être mortelles.

Les études de prévalence sont limitées à un nombre relativement réduit de germes essentiellement pour des raisons liées aux techniques de mise en évidence (Figures 1 et 2). Ainsi, on peut voir essentiellement les Rotavirus et Coronavirus, l'Escherichia coli F₅ (anciennement K₉₉), les salmonelles et les cryptosporidies (Duhamel, 2000 ; Naylor, 2001).

Ces agents agissent de façon spécifique au niveau de l'intestin et à un âge précis.

- E.coli entérotoxigènes : 0 à 10 jours d'âge et principalement les veaux de moins d'une semaine (Navetat, 1999 ; Radostits et al., 2001).
- Rotavirus : 1 à 12 jours.
- Coronavirus : 5 à 30 jours, mais principalement entre 5 et 10 jours.
- Salmonelles : à partir de deux jours.
- Cryptosporidies : 5 à 15 jours (Navetat, 1999).

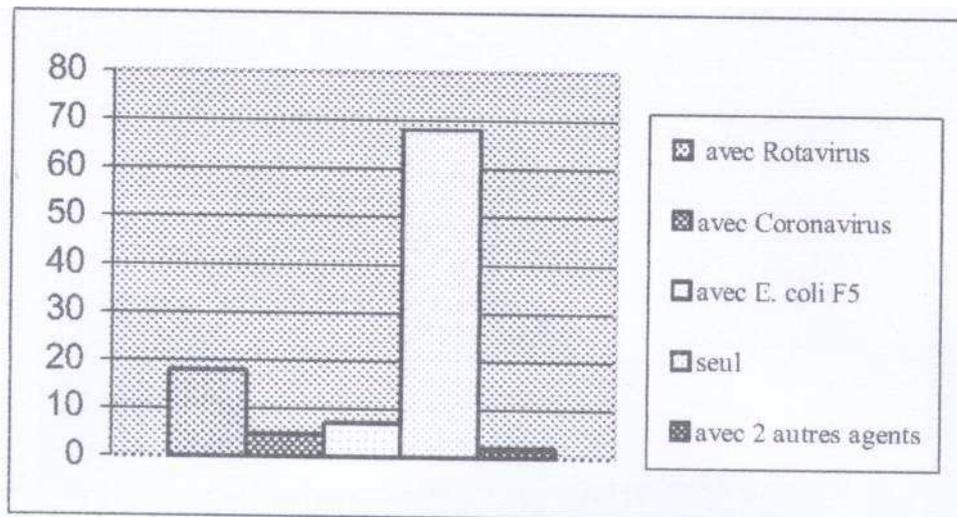


Figure 1 : fréquence d'isolement de Cryptosporidium seul ou en association avec un ou plusieurs des autres agents recherchés

(n = 211 veaux diarrhéiques de 0 à 30 jours) d'après Constant 2001.

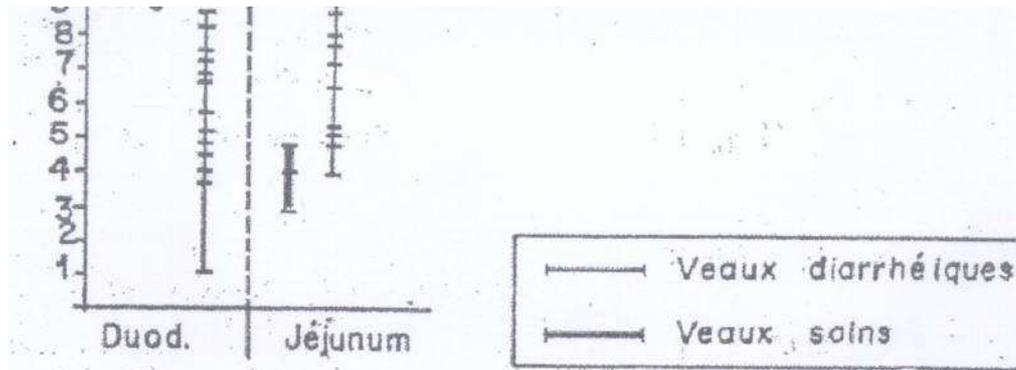


Figure 2 : Nombre d' **E.coli** dans le duodénum et le jéjunum des veaux sains et malades (Gouet et al 1980)

Des études récentes ont montré que l'incidence de l'infection à Escherichia coli F₅ a diminué considérablement (Ganaba, 1995 ; Naylor, 2001), alors que les fréquences d'isolement des ookystes de cryptosporidies ne cessent d'augmenter dans le monde depuis les années 80 (Constant, 2001).

En France, une étude rétrospective de 1994 à 1998 conduite au Laboratoire Départemental d'Analyses de la Haute-Vienne (LDA 87) (Constant, 2001) confirme l'augmentation de la cryptosporidiose chez les veaux âgés de moins d'un mois. Le protozoaire parasite est ainsi isolé dans 29,8% des cas c'est à dire presque autant que le Rotavirus (33,5% des cas), loin devant les Coronavirus et Escherichia coli. On peut voir des résultats similaires au LDA de l'Allier en 1997 où dans 23% des cas Cryptosporidium a été isolé et dans 24% le Rotavirus.

La cryptosporidiose est maintenant présente dans toute la France, avec toutefois une grande disparité selon les régions (Lefay, Naciri, Poirier et Chermette, 2000). Ainsi, parmi 440 veaux diarrhéiques répartis sur 10 départements, 43,4% se sont avérés porteurs, avec un minimum de 17,9% pour le Maine et Loire et un maximum de 70,4% pour le Cantal. Par ailleurs, les études récentes tendent à démontrer que Cryptosporidium est plus qu'un simple agent opportuniste et qu'il serait peut être aujourd'hui un agent majeur du syndrome « diarrhée néonatale » chez le veau, au même titre que le Rotavirus.

En effet, dans l'étude menée au LDA 87, Cryptosporidium a été isolé seul pour 68,2% des 211 veaux diarrhéiques porteurs de cet agent pathogène. Deux autres études similaires présentent des résultats respectivement de 52,6% et 51,3% des cas (De La Fuente, Luzon, Ruiz-Santa-Quiteria, Garcia, Cid, Orden et Gomez-Bautista, 1999 ; Moore et Zeman, 1991).

Ces travaux ont également mis en évidence que les deux agents les plus fréquemment associés étaient Rotavirus et cryptosporidies. Par ailleurs, il convient de poursuivre l'étude épidémiologique : les changements des conditions d'élevage, l'immunité naturelle au sein des troupeaux, les thérapeutiques ne sont pas en effet sans incidence sur l'évolution de la pathologie. Beaucoup d'autres agents infectieux ont été identifiés dans les gastro-entérites néonatales des veaux : des virus (BVDV, Parvovirus, Torovirus), des bactéries (Campylobacter, Colibacilles) et des protozoaires (Giarda).

Au cours de l'hiver 1986 (Navetat, 1999), dans la région charolaise, on a observé un tableau clinique apparemment non décrit jusque là. Ce syndrome est identifié sous le terme de « Gastro-entérite Paralysante » (GEP), atteignant les veaux d'environ 10 jours.

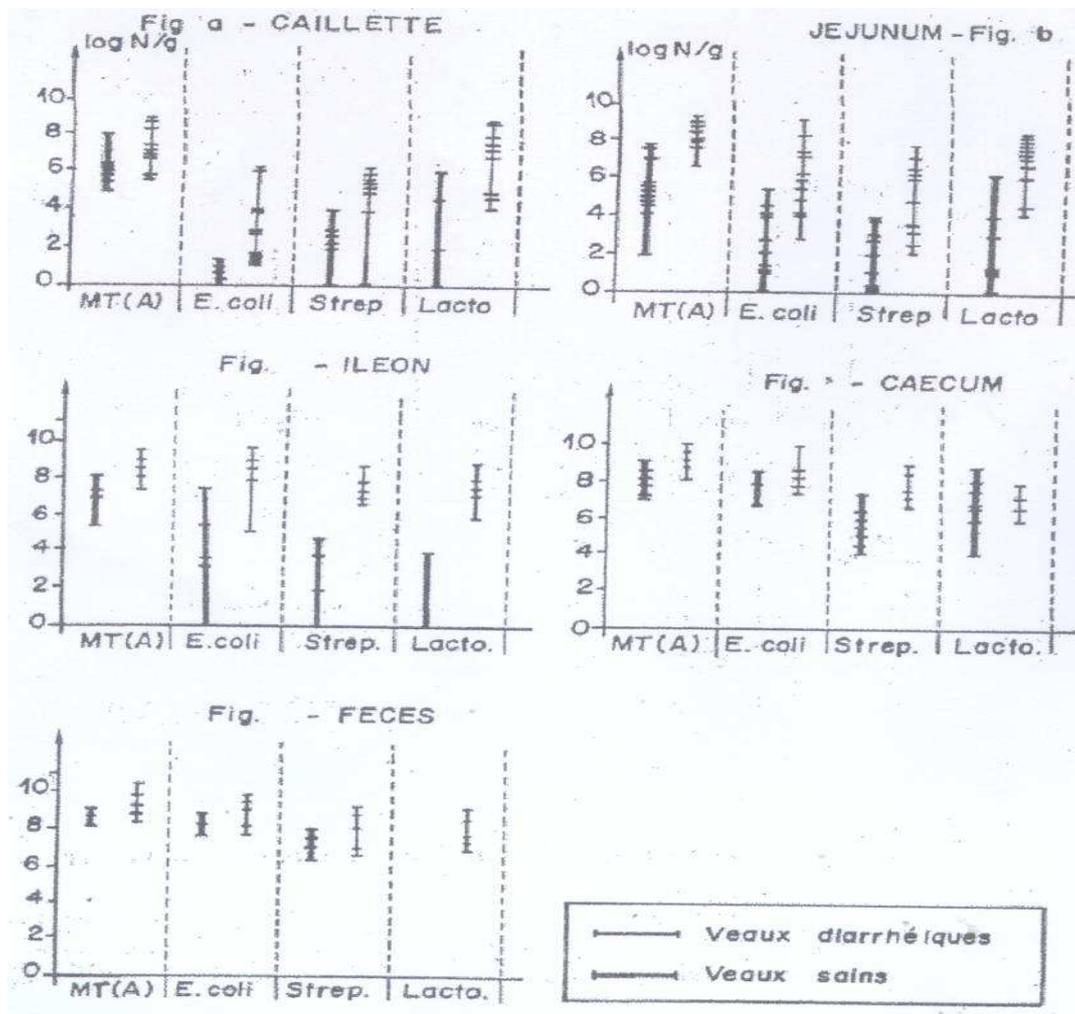


Figure 3 : Dénombrement de la microflore (en aérobiose)

E coli , Streptococcus , Lactobacillus dans différents segments du tube digestif

(Gouet et al. 1980)

2.1.1. Les agents bactériens :

2.1.1.1. La microflore banale et pathogène du veau nouveau-né

Le nouveau-né, dont le tube digestif est stérile et dépourvu d'immunité à la naissance, a de grandes chances de ne pouvoir résister à l'agression des bactéries pathogènes. Mis en présence de plusieurs écosystèmes bactériens différents tels que le vagin et les fèces de la mère puis le sol et l'atmosphère, il doit établir très rapidement un système de défense contre cet environnement hostile. La microflore digestive, associée à l'immunité colostrale, va jouer dans ce domaine un rôle capital (Tennant, Ward, Braun, Hunt et Baldwin, 1978).

La microflore digestive va ainsi se développer très rapidement dans le tube digestif du nouveau né et on peut affirmer que dans les 24 heures au plus qui suivent la naissance, le nombre totale de bactéries aura atteint sa valeur maximale (10^9 - 10^{10} / g de fèces) qui restera constante tout au long de la vie l'individu (Radostits, Gay, Blood et Hinchcliff, 2001). Par ailleurs, la colonisation du tube digestif se fait nullement au hasard. Elle résulte, au contraire, d'une très ancienne et très étroite adaptation des espèces bactériennes aux différentes niches du tube digestif, l'hôte nouveau-né étant à même d'effectuer directement ou indirectement un tri parmi les espèces qui se présentent.

Parmi les bactéries qui contaminent le nouveau-né, certaines seront incapables de s'implanter et les premières espèces qui s'établissent ne sont pas nécessairement celles qui sont les plus abondantes dans les différents écosystèmes rencontrés puisque certaines seront définitivement éliminées par d'autres qui se présenteront plus tard (Gouet, Contrepois et Dubourguier, 1980). Alexander (1971) considère d'ailleurs que, pour pouvoir coloniser le tube digestif, les espèces bactériennes doivent être autochtones, c'est à dire à même de se développer, s'implanter dès la naissance, être toujours présentes chez les adultes normaux, coloniser des zones particulières du tube digestif, rester stable chez l'adulte; enfin être intimement associées à l'épithélium. A l'opposé, on doit considérer que les bactéries pathogènes sont des allochtones puisqu'elles ne sont présentes dans le tube digestif qu'à l'occasion d'événements anormaux et pour une durée limitée (Naylor, 2001).

L'hôte agit sur l'équilibre de la microflore bactérienne qu'il héberge grâce à un certain nombre de mécanismes. Le péristaltisme, la température, le potentiel d'oxydoréduction, les sécrétions digestives exercent en effet une influence déterminante. Un dérèglement de ces mécanismes pourrait alors accompagner un accroissement important de certaines bactéries de la microflore dans un des compartiments donnés du tube digestif et provoquer ainsi un déséquilibre ou l'apparition de bactéries pathogènes. On peut en effet voir ce phénomène lors d'hypomotricité de l'intestin grêle chez le veau atteint de diarrhée avec l'apparition des *Escherichia coli* pathogènes.

En fait, on peut voir différents types d'infestation du tractus digestif du jeune veau dus à des bactéries (Moon, Mc Clurkin, Isaacson et Pohlenz, 1978 ; Groove-White et White, 1993 ; Cebra, Garry, Cebra, Adams, Mc Cann et Fettman, 1998) :

- les salmonelloses induites par Salmonella dublin et Salmonella typhimurium, atteignant des veaux souvent âgés de plus de trois semaines, et provoquant des septicémies rapidement mortelles. Les agents pathogènes sont des bactéries intracellulaires facultatifs,
- les entérotoxémies provoquées par Clostridium perfringens
- les colibacilloses dues à Escherichia coli, bactérie à Gram négatif.

Si la prévalence des Escherichia coli dans les diarrhées néonatales des veaux a baissé ces dernières années (Naylor, 2001 ; Radostits et al., 2001), les colibacilloses représentent encore une des principales causes de pertes économiques de l'élevage dans le monde chez les jeunes veaux. L'étude se portera donc principalement sur cet agent bactérien, cependant, il est quand même important de souligner certains détails :

* tout d'abord, contrairement à des espèces fortement pathogènes comme Salmonella, la pathogénicité d'Escherichia coli ne peut être liée à sa seule présence dans l'intestin du veau malade puisqu'Escherichia coli est un hôte normal du colon et du caecum, s'implantant dès la naissance chez le jeune. Smith (1965), Contrepois et Gouet (1973, 1977) en suivant l'évolution des genres bactériens dominants (E.coli, Clostridium, Streptococcus, Lactobacillus, Bactéroïdes) chez des veaux sains âgés de quelques heures à une douzaine de jours, ont, en effet, montré qu'E.coli apparaît chez l'animal âgé de 8 heures et que c'est à 24 heures que les dénombrements sont les plus élevés ; dans la caillette, le duodénum et jéjunum (Fig.3), ils peuvent être absents ou ne dépassent généralement pas quelques milliers par gramme. Ils apparaissent nettement à partir de l'iléon (10^4 - 10^8 /g) et c'est dans le caecum et le colon qu'ils atteignent 10^9 /g et parfois plus. Au plan qualitatif, il s'avère en premier lieu que les souches d'E.coli isolées des veaux sains (E.coli saprophytes) possèdent des caractères tout à fait différents de ceux des veaux malades (E.coli pathogènes).

* D'autre part, comparativement aux animaux sains, la microflore des veaux atteints de diarrhée se caractérise par une augmentation générale du nombre de bactéries anaérobies facultatives, principalement des E.coli mais également des streptocoques et des lactobacilles. Cette augmentation est particulièrement prononcée dans la caillette et l'intestin grêle puis s'estompe dans le caecum où la population bactérienne, y compris E.coli est normalement élevée (Fig.3).

2.1.1.1.1. Les Escherichia coli pathogènes :

A₁- Généralités :

La colibacillose recouvre deux grands syndromes : un syndrome diarrhéique avec déshydratation (entérototoxicose colibacillaire) provoqué par les colibacilles « entérotoxinogènes » (E.C.E.T) et un syndrome septicémique (septicémie colibacillaire) provoqué lui par des colibacilles « invasifs ».Nielsen, Moon et Roe (1968), puis Smith et Linggood (1972) ont permis de comprendre la cause du pouvoir pathogène de ces bactéries entérotoxinogènes. Ils ont en effet d'abord établi chez le porc puis chez le veau qu'un colibacille doit posséder deux caractéristiques fondamentales pour être pathogène :

- posséder des antigènes capsulaires lui permettant de se fixer à la paroi intestinale.
- Posséder la capacité de sécréter une ou plusieurs entérotoxines, c'est à dire des exotoxines capables de stimuler fortement la sécrétion des cellules intestinales, donc de produire le liquide diarrhéique.

Les informations génétiques codant pour les antigènes capsulaires et les toxines sont portées par des plasmides.

La connaissance de ces caractères de pathogénicité de ce type de colibacille va permettre de mieux comprendre la pathogénie de cette infection.

A₂- Adhésion des E.coli entérotoxinogènes :

En général, les épithéliums en contact avec une microflore sont équipés de mécanismes de défense efficaces contre la colonisation de leur surface par des bactéries : cils vibratiles, synthèse de mucus, flux liquides débarrassent, dans la plupart des cas, les surfaces épithéliales des micro-organismes du milieu. La manifestation du pouvoir pathogène des E.coli nécessite leur attachement à la surface des entérocytes. Ainsi, les E.C.E.T. possèdent une structure d'attachement leur permettant d'adhérer aux membranes cellulaires des entérocytes sans être gênées par la couche de mucus.

Depuis Contrepois et Gouet (1983) ; il a été décrit pour les E.C.E.T. bovins trois adhésions différentes ; F₅ (anciennement K₉₉), F₄₁ (Morris, Thorns et Sojka, 1980) et F_y, représentant chacune une structure particulière des enveloppes coexister chez un même E.C.E.T.

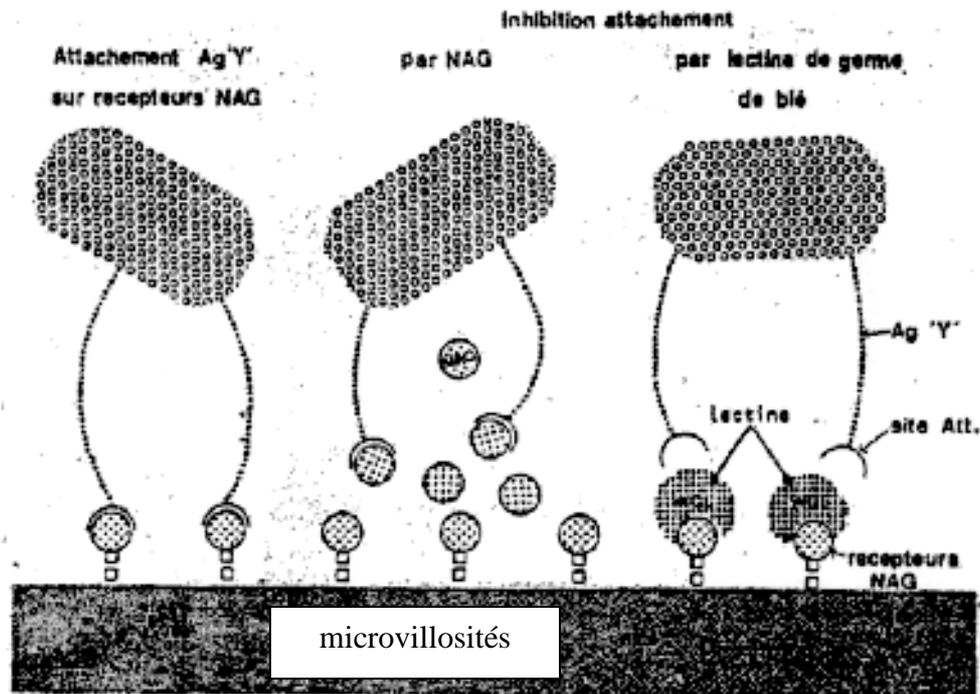


Figure 4 : modèle réalisé par inhibition de l'attachement au niveau des sites récepteurs entre bactérie et villosité (NAG= N Acétyl Glucosamine)
(Girardeau et al. 1980)

Les études de l'attachement *in vitro* par Girardeau, Dubourguier et Contrepois (1980) ont présenté l'antigène K₉₉ (F₅) en microscopie électronique comme un fin filament protéique. Le diamètre des fibres a pu être estimé à 3nm, alors que la longueur dépasse largement les dimensions de la bactérie soit 2 à 3000 nm. Quant à l'antigène Fy, il se rapproche en microscopie électronique de l'antigène K₉₉, bien plus dense avec formation de gros paquets de fibres par auto-agglutination.

Il faut souligner que l'étude des structures à très haut poids moléculaire (plusieurs millions) présente de nombreuses difficultés techniques liées à l'instabilité de ces extraits, celle-ci étant à l'origine des contradictions observées entre les différentes équipes étudiant les propriétés de l'antigène K₉₉. L'estimation du p*H*_i en est l'exemple le plus significatif puisqu'il varie entre 4,5 et 10,2.

Suite à leur étude *in vitro* et après extraction et purification, Girardeau et al. (1980) ont obtenu un antigène K₉₉ cationique avec un p*H* iso-électrique compris entre 10 et 10,2, caractéristique intéressante pouvant jouer un rôle dans le déroulement de l'attachement. En effet, à p*H* physiologique du tube digestif (6,5 à 7), l'antigène K₉₉ présente une forte charge positive susceptible d'être attirée par les charges négatives des mucopolysaccharides du

mucus couvrant l'épithélium intestinal. Ils ont confirmé cette hypothèse par la sensibilité au pH de l'attachement in vitro sur villosité intestinale de lapin et de veau.

Par ailleurs, Girardeau et al. (1980) ont pu mettre en évidence une inhibition de l'attachement de souches Y par la N-acétyl glucosamine sur des villosités de veau (Fig.4). Une inhibition par la lectine de blé est également montrée, celle-ci est due à la reconnaissance de l'antigène Y avec une structure stéréospécifique de nature protéique sur le site récepteur ; pour cette raison, certains auteurs associent ce type d'antigène d'attachement à des lectines spécifiques de sites récepteurs glucosidiques. Ainsi, il y a fixation entre les pili et le glycosalyx (« fuzz ») avec mise en jeu de récepteurs saccharidiques ou peptidiques. Toutes ces structures d'attachement vont donc permettre aux colibacilles de couvrir la surface épithéliale intestinale, de s'y fixer et de s'y multiplier activement sans être entraînés par le transit intestinal. Les bactéries vont ainsi pouvoir manifester leur pouvoir pathogène ; l'attachement permettant, en effet, de délimiter un espace confiné dans lequel la toxine est libérée de sorte qu'elle va, sans dilution dans le milieu intestinal, se lier directement à des récepteurs membranaires des entérocytes.

A₃- Mode d'action des bactéries : les entérotoxines

Les E.coli synthétisent des toxines dont certaines sont :

- des endotoxines : substances faisant partie de la paroi des bactéries et libérées lors de leur lyse. Les réactions qu'elles provoquent sont très variables selon les espèces et l'individu (Van Miert et Frens, 1968). Ces endotoxines pourraient jouer un rôle dans la diarrhée néonatale des veaux non pas en tant que responsables de la sécrétion des fluides par l'intestin, mais en induisant des perturbations circulatoires et métaboliques générales.
- d'autres, les exotoxines sont des substances élaborées par les bactéries pendant leur croissance (Dubourguier, Contrepois et Gouet, 1979) que ce soit in vitro ou in vivo. Leur libération ne dépend pas de la lyse des bactéries mais elle est le fait d'une diffusion ou d'un transport au travers de la paroi bactérienne.

Dans le mécanisme de la diarrhée des veaux, ce sont en fait les exotoxines à tropisme intestinal : les entérotoxines qui jouent un rôle important.

Chez certaines bactéries, il existe deux entérotoxines : l'une thermolabile (TL) qui agit par l'intermédiaire de l'AMPc comme la toxine du choléra, l'autre thermostable (TS) qui ne fait pas intervenir l'AMPc.

Chez E.coli entérotoxigène bovin, seule l'entérotoxine thermostable (Sta) est rencontrée (Contrepois et Gouet, 1983). Dubourguier et al. (1979) ont démontré que l'entérotoxine thermostable est responsable de l'ensemble des symptômes observés chez le veau diarrhéique. En effet, on a pu voir la même évolution clinique (mort en 24-48 heures en état de déshydratation) après administration de 10^{10} E.coli entérotoxigènes (K_{99}^+ , TS^+) et par perfusion directe de la toxine Ts dans l'intestin du veau. Ainsi, la souche la plus virulente connue de nos jours des E.C.E.T chez le veau est la souche F₅ (K₉₉) ST (Radostits et al., 2001).

En fait, les entérotoxines induisent une sécrétion nette d'eau et d'électrolytes (sodium, chlorures et potassium) vers la lumière intestinale, après contact avec la muqueuse intestinale par un mécanisme indépendant des lésions cellulaires structurales. Bywater (1977) a, en effet, montré que ces pertes étaient les plus importantes dans la partie distale de l'intestin grêle (Fig.5).

La réponse aux exotoxines est locale ; ces substances n'agissant que dans les segments inoculés et non dans les segments adjacents. Des résultats expérimentaux convergents font penser que la toxine thermostable (TS) active un système enzymatique qui provoque l'augmentation de la guanosine monophosphate cyclique dans les cellules de la muqueuse, et ensuite induit la sécrétion d'eau et d'ions HCO_3^- . Par ailleurs, la toxine pourrait agir comme un secrétagogue, lequel se liant à la bordure en brosse des cellules épithéliales, entraîne une augmentation de Ca^{++} à l'intérieur des cellules. A partir d'une certaine concentration, le Ca^{++} forme un complexe avec la calmoduline ou « calcium-dependent-regulator » (Means et Dedman,

1980 et Cheung, 1982). En fait, on peut voir une fuite de NaCl au niveau des espaces intercellulaires d'où la sécrétion. Ces mécanismes n'altèrent pas la muqueuse elle-même mais entraînent un « dysmétabolisme hydro-minéral » éventuellement mortel (Dubourguier et al., 1979 ; Radostits et al., 2001, b, c).

Par ailleurs, dans ces diarrhées, la perte d'eau et d'électrolytes est due à un processus sécrétoire sans modification apparente de l'absorption. Ainsi, certains substrats pourraient toujours permettre l'augmentation de l'absorption. En fait, Bywater (1977) a montré que bien qu'il y ait une réduction apparente de l'absorption du glucose et de la glycine lors de ces diarrhées, celle-ci est relativement faible, et n'est donc en aucun cas statistiquement significative. Cette absorption du glucose et de la glycine chez ces veaux diarrhéiques justifie l'utilisation, pour la réhydratation par voie orale, de solutions contenant ces substrats, puisque leur absorption s'accompagne d'une absorption de sodium et d'eau, ce qui permettra de

compenser ou sinon d'abolir les pertes nettes d'eau et d'électrolytes engendrées par les toxines (Radostits et al., 2001).

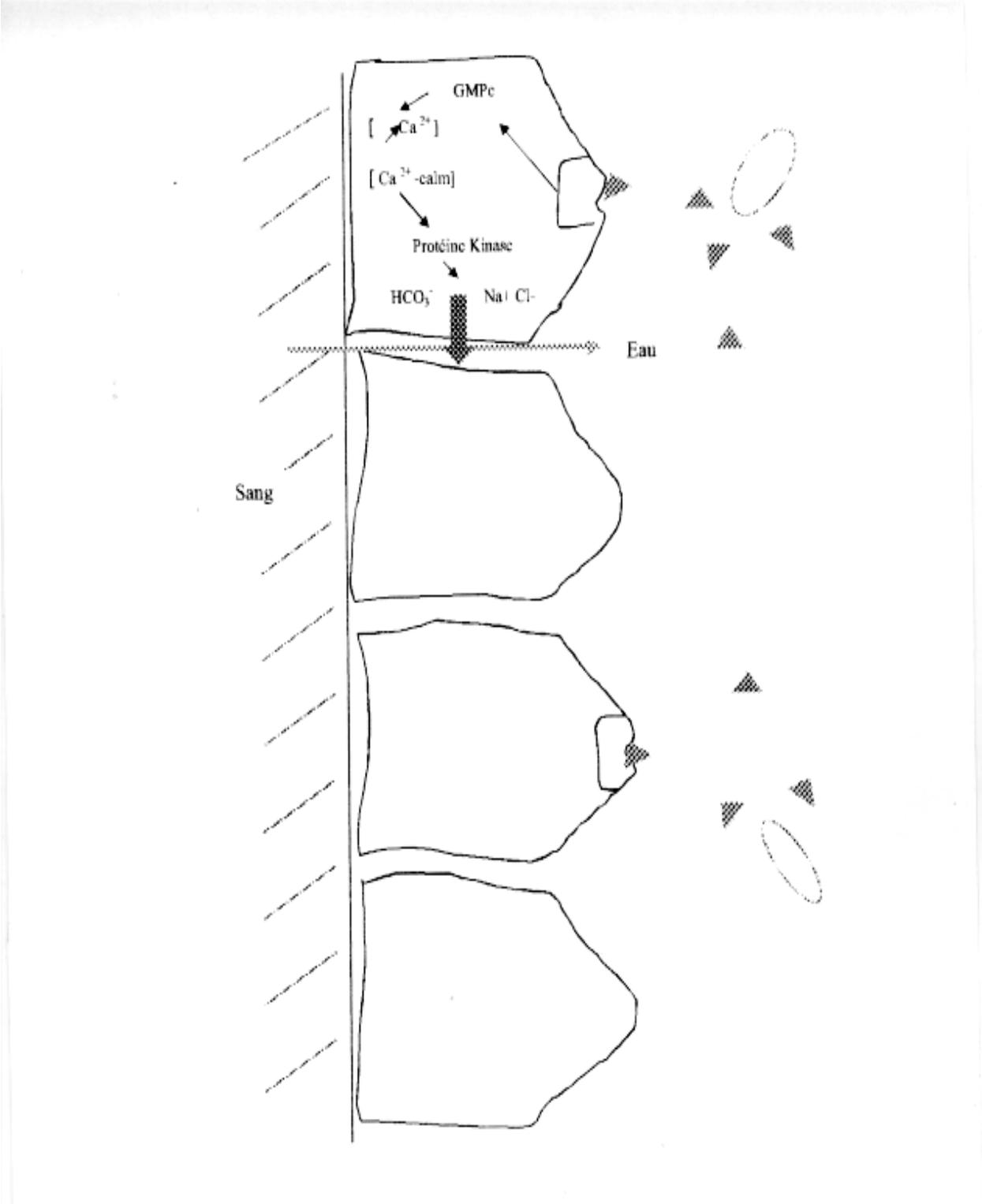


Figure 5 : Représentation schématique de l'action de l'entérotoxine Ts à la surface de la muqueuse intestinale lors d'infection à E.coli.

(d'après Bywater 1977, Dubourguier et al , 1979, Contrepois et Gouet ,1983).

2.1.2. Les agents parasites :

Seule la cryptosporidiose sera ici étudiée. Les protozoaires responsables sont les cryptosporidies. Ce sont des parasites intestinaux pouvant provoquer à eux seuls des diarrhées graves chez le jeune veau (Constant, 2001).

A1. Epidémiologie :

Parmi ces protozoaires, un seul genre est connu : le genre Cryptosporidium parvum. Il semble que ce parasite ne soit pas spécifique et qu'il puisse se développer, avec ou sans manifestations cliniques, chez un grand nombre d'hôtes.

Quoiqu'il en soit, la cryptosporidiose atteint les veaux âgés de 5 à 15 jours (Navetat, 1999 ; Chartier, 2001 ; Radostits et al., 2001), la mortalité est faible alors que la morbidité est voisine de 100%. La cryptosporidiose atteint essentiellement les élevages allaitants (Chartier, 2001). Un effet saison est par ailleurs à souligner pour la fréquence d'isolement des cryptosporidies, avec une augmentation de Janvier à Mars.

Le cycle de développement de C.parvum est d'assez courte durée. Quatre à six jours après l'inoculation, on observe des oocystes dans les matières fécales des animaux infectés (Naciri et Yvore, 1983) . C'est un cycle classique des coccidies avec multiplications asexuées puis apparition d'un stade sexué et formation après fécondation du gamète femelle, d'oocystes éliminés en grande quantité avec les matières fécales pendant la deuxième semaine d'existence des veaux (Fig.6). Chartier, 2001).

Il existe, cependant, deux particularités majeures par rapport au cycle classique des coccidies qui contribuent à conférer à l'épidémiologie de la cryptosporidiose un caractère « explosif » :

- *- les oocystes éliminés dans le milieu extérieur sont sporulés et donc directement infectieux pour un autre animal ;
- *- environ 20% des oocystes produits dans l'intestin peuvent s'ouvrir dans celui-ci en libérant des sporozoïtes, qui vont, à leur tour, envahir de nouvelles cellules épithéliales intestinales. Il y a donc possibilité d'auto-infection.

Chartier (2001) souligne la similitude entre l'infection naturelle et l'infection expérimentale : il y a en effet simultanément entre la diarrhée et les comptages élevés

d'oocystes, ce qui plaide pour un rôle prépondérant de l'infection initiale et un rôle beaucoup plus faible des réinfections.

Les ruminants adultes jouent un rôle de réservoirs de parasites. Ce portage asymptomatique quasi-généralisé a une importance dans la contamination environnementale, et tout particulièrement au niveau des eaux. A l'inverse, cet aspect ubiquiste limite le rôle du portage des adultes dans la genèse de la cryptosporidiose néonatale et ne permet pas de discriminer les exploitations à risques. Le rôle des adultes pourrait se limiter dans certains cas à l'initialisation de l'infection des jeunes, celle-ci étant un relais obligatoire pour amplifier la circulation du parasite et pour permettre, plus tard dans la saison de la mise bas, des infections plus lourdes des nouveaux nés et l'éclosion de cryptosporidiose clinique (Chartier, 2001).

A₂. Pouvoir pathogène:

Pohlenz, Bemrick, Moon et Cheville (1992) ont étudié les différents stades de développement de ce parasite au niveau de l'intestin du veau. Ce sont surtout les parties postérieures de l'intestin grêle qui sont parasitées. L'iléon est le lieu de développement le plus fréquent, cependant, plus rarement, certains parasites peuvent de développer au niveau du jéjunum. En fin, l'infection peut s'étendre jusqu'au colon.

En microscopie à balayage, les cryptosporidies apparaissent comme des corps sphériques distribués à la surface des villosités intestinales atrophiées (Naciri et Yvove, 1983). Elles sont soit au sommet des villosités, à la surface de la cellule en brosse, soit dans la bordure en brosse, attachées à la surface de la cellule épithéliale. En fait, d'après Navetat (2001), par sa position intracellulaire mais extracytoplasmique dans la bordure des entérocytes, Cryptosporidium parvum entraîne la disparition des villosités au site d'attachement, le raccourcissement et l'épaississement des microvillosités adjacentes, provoquant des troubles de l'absorption.

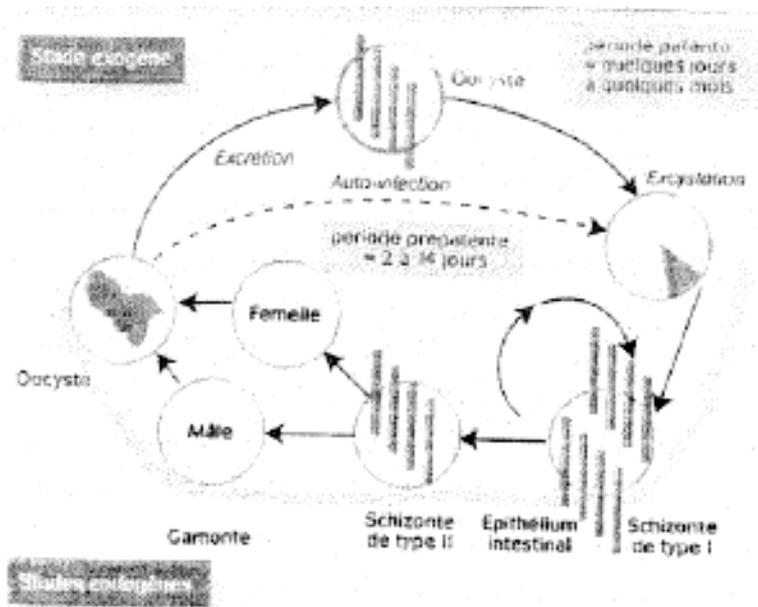


Figure 9 : Cycle de Cryptosporidium parvum
(Chartier 2001)

Des vacuoles sont éparpillées dans le cytoplasme des cellules parasitées ou localisées autour du noyau et les mitochondries sont gonflées et vacuolées. Du fait des modifications morphologiques importantes, les taux d'enzymes dans la bordure en brosse sont diminués. La baisse du taux des lactases microvillositaires interfère avec l'absorption des nutriments conduisant à la malabsorption et à la malnutrition. La diarrhée chez le veau serait due à l'accumulation de nutriments hypertoniques non absorbés dans la lumière du gros intestin (Naciri et Yvone, 1983 ; Chartier, 2001 ; Radostits et al., 2001).

Cependant, les pertes très importantes d'eau et d'électrolytes lors des infections à Cryptosporidium chez les sidéens font penser à un effet entérotoxique plutôt qu'à un effet cytotoxique et la présence d'un facteur entérotoxique dans les fèces des veaux infectés et son activité sur du jéjunum humain monté en chambre de Ussing a été démontré.

Argenzio (1984) attribue la diarrhée à une inhibition de l'absorption de Na^+ . Le facteur responsable (vraisemblablement une protéine) est thermolabile et calcium-dépendant. Ce facteur peut être soit une entérotoxine ou une hormone excrétée par le parasite soit une hormone ou un métabolite biochimique sécrété par les cellules intestinales infectées, soit le résultat d'une stimulation du système immunitaire systémique ou entérique de l'hôte ou du système nerveux entérique.

La microscopie électronique révèle aussi une réaction inflammatoire avec infiltration cellulaire de cellules plasmatiques neutrophiles, macrophages et lymphocytes dans la lamina propria et une hypertrophie des cryptes. Ainsi, l'apparition de la diarrhée serait non seulement due à une diminution de l'absorption mais également à une augmentation des sécrétions. Les études sur les médiateurs locaux de l'inflammation lors de la diarrhée doivent être poursuivies pour une meilleure connaissance des mécanismes de la diarrhée pourra aider au développement d'une thérapie anti-sécrétoire appropriée en l'absence de traitement antiparasitaire spécifique.

2.1.3. Les agents viraux :

2.1.3.1. Les virus :

Depuis l'observation successive dans des matières fécales de veaux diarrhéiques au microscope électronique par Mebus (Mebus, Underdahl, Rhodes et Tuviehaus, 1969) du Rotavirus (appelé à l'époque « reo-like virus ») et du Coronavirus entérique bovin, il est apparu que ces deux virus jouent un rôle important dans l'étiologie des gastro-entérites néonatales, compte tenu de leur pouvoir pathogène et de leur incidence.

2.1.3.1.a. Rotavirus :

Les Rotavirus ont été classés dans la famille des Reoviridae, dont ils constituent un des genres. Leur appartenance à cette famille s'effectue sur les critères suivants :

- *-ARN bicaténaire et segmenté (10-12 fragments) ;
- *-Caractéristique structurale : symétrie icosaédrique, une ou deux capsides(s) ;
- *-Stratégie de réplication commune.

Les particules virales ainsi mises en évidence sont non enveloppées, parfaitement sphériques et ont un diamètre d'environ 70 nm. La particule virale comporte un « core » constitué de trois protéines majeures et renfermant le matériel génétique formé d'un ARN bicaténaire et segmenté (11 fragments) et non infectieux. Ce matériel génétique est empaqueté au centre du core (diamètre de 49 nm). En outre, deux des protéines majeures de ce core ont une activité enzymatique liée au virion : une nucléoside-phospho-hydrolase et une ARN polymérase-ARN-dépendante qui agit in situ en transcrivant l'ARN viral en ARN messager. Cet élément central est entouré d'une première capsid (capsid interne constituée d'un seul polypeptide), formant ainsi les particules incomplètes (encore appelées particules rugueuses ou D).

Les virions complets ou infectieux possèdent, en outre, une seconde capsid (capsid externe) qui se présente en coloration négative comme un liseré de 10 nm d'épaisseur.

Ces virions complets sont encore appelés particules lisses ou L. On peut donc, en réalité, observer trois types de particules de Rotavirus : double enveloppe (infectieux), simple enveloppe et core (tous deux non infectieux) (Scherrer et Laporte, 1983).

Par ailleurs, quant aux protéines externes, les deux polypeptides de plus faible masse moléculaire jouent un rôle dans l'attachement du virus aux cellules. En effet, les particules rugueuses, qui ont perdu leur infectivité, ont également ces deux polypeptides en moins et Cohen (1979) a montré in vitro qu'elles ne s'adsorbent pas aux cellules sensibles.

Cette capsule externe via les polypeptides, détermine les antigènes de surface. Il existe 7 sérogroupes connus (de A à G), eux-même classés en sérotypes. Les Rotavirus impliqués dans la diarrhée néonatale des veaux font partie des sérogroupes A (Radostits et al., 2001 ; Naylor, 2001). On connaît 14 G et 12 P sérotypes de ce groupe (Radostits et al., 2001). Ce sont contre ces antigènes de surface que sont dirigés les anticorps neutralisants, qu'ils proviennent du colostrum du lait ou qu'ils soient synthétisés dans le tractus intestinal du veau.

2.1.3.1.b. Coronavirus :

Lors de sa mise en évidence, le Coronavirus du veau a été classé dans la famille des Coronaviridae sur une base uniquement morphologique (Cohen, 1979). Ces virus ne comprennent qu'un seul genre.

Au microscope électronique, on distingue des particules virales après coloration négative ; elles sont assez pléomorphes, mais généralement sphériques ou ovales. Le virion a un diamètre d'environ 10 nm avec une frange de spicules à extrémité renflée constituant une couronne (Corona en latin) qui a donné son nom à la famille. L'information génétique est portée par un ARN monocaténaire non segmenté de polarité positive.

2.1.3.1.c. Epidémiologie :

Ces viroses touchent les veaux de 0 à 3 semaines (Scherrer et Laporte, 1983), mais principalement les jeunes animaux âgés de quelques jours (Navetat, 2001). Le pic d'incidence du Rotavirus se situe aux alentours du 6^{ème} jour après la naissance (Scherrer, Cohen, L'Harridon, Fey-Nerol et Fayet, 1976).

Le passage de veaux à veaux se fait très facilement : les jeunes veaux se contaminent en effet par ingestion de particules virales (contamination fécale-orale) présentes en quantités

abondantes dans le milieu extérieur. La contamination par le Coronavirus peut également se faire par voie aérienne sachant que le Coronavirus se multiplie aussi au niveau du nasopharynx. Dans ce cas, l'animal s'infecte par voie aérienne et déglutit le virus qui peut ensuite coloniser les villosités intestinales.

Plusieurs facteurs favorisent la contamination massive et persistante de l'environnement (Navetat, 2001 ; Radostits et al., 2001) :

- *- l'excrétion de nombreuses particules virales dans les fèces de veaux infectés (10^{10} à 10^{12} particules/millilitre)
- *- l'excrétion quasi-continue de virus par des animaux à infection subclinique (porteurs sains).
- *- la résistance du virus dans le milieu extérieur.

En effet, l'organisation de la capsidie en double couche protéique et l'absence d'enveloppe sont responsables de la stabilité des Rotavirus, en particulier à la chaleur. En effet, ceux-ci sont thermosensibles ce qui explique leur recrudescence en hiver (Radostits et al., 2001). Ils sont stables à 4°C ou 20°C pendant des mois, certains résistent à 45-50°C mais perdent leur hémagglutinine. La résistance du Coronavirus reste quant à elle faible dans l'environnement : perte de l'infectivité en moins de 36 heures à température ordinaire ou après dessiccation. Il s'inactive en 1 heure à 50°C.

Le Rotavirus est particulièrement stable puisqu'il est résistant à l'éther, au chloroforme et au désoxycholate. Il est stable dans une gamme de pH très variable : de pH 3 à 10 et il résiste aux enzymes protéolytiques (Cohen, 1979) ce qui facilite également l'infection. Le Coronavirus est moins résistant dans l'environnement puisqu'il est stable uniquement à un pH acide et sensible à l'éther et à la plupart des désinfectants (formol, phénol).

Les infections asymptomatiques à Rotavirus et Coronavirus sont couramment observées chez les bovins, mais il est significatif de constater que la fréquence de ces infections est relativement faible par comparaison avec les sujets malades. Ainsi, moins de 13% des veaux sains âgés de 10 à 20 jours excrètent le Rotavirus sans manifester de signes cliniques (Scherrer et Laporte, 1983).

2.1.3.1.d. Pathogénie :

Le pouvoir pathogène des Rotavirus et Coronavirus pour les entérocytes différenciés de l'épithélium intestinal a été bien démontré essentiellement par l'équipe de Mebus (Mebus, Newmann et Stain, 1975 ; Mebus, Stain, Underdahl et Twiehaus, 1971) aux Etats-Unis.

Le virus pénètre chez l'animal par voie orale. Après passage de l'estomac (résistance du virus à pH acide), il migre vers l'intestin où se trouvent les cellules cibles : les cellules différenciées de la bordure en brosse qui recouvrent les villosités du jéjunum et de l'iléon voire même du colon et du rectum pour le Coronavirus .

Le développement de ces deux virus a lieu dans le cytoplasme des cellules qu'ils infectent, les entérocytes ; la première étape de réplication du virus est son adsorption sur la cellule cible, souvent au niveau des récepteurs spécifiques. Les spicules du Coronavirus sont vraisemblablement responsables de cette adsorption spécifique.

La seconde étape est la pénétration de la particule virale dans le cytoplasme, au travers de la membrane, soit vraisemblablement par phagocytose dans le cas du Rotavirus, soit par fusion des membranes cellulaire et virale, dans le cas du Coronavirus qui est enveloppé.

La troisième étape conduit par des phénomènes divers à la libération du génome dans le cytoplasme de la cellule. Cet ARN est alors répliqué, transcrit en ARNs messagers qui seront, à leur tour, traduits par la machinerie cellulaire en protéines enzymatiques et structurales spécifiques du virus.

La dernière étape est la morphogénèse de nouveaux virions à partir des protéines structurales et des ARN-fils produits.

Cet assemblage se fait dans des « factories » ainsi que l'a montré Sharp, Mebus et Bass (1976). Ces formations sont situées dans le cytoplasme de la cellule et associées à la membrane du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

Pour ce qui concerne le Coronavirus , après que la nucléocapside ait bourgeonné, les spicules sont rajoutées aux particules qui viennent d'être formées (10 à 100 virions par cellule).

Les virions sont alors libérés dans la lumière intestinale, soit par « éclatement » de la cellule infectée (Coronavirus et Rotavirus), soit par « bourgeonnement » sur les membranes cellulaires Laporte (1980) pour le Coronavirus . La durée du cycle est de 6 heures pour le Coronavirus et environ de 16 heures pour le Rotavirus, ce qui correspond à la libération de virions dans le milieu extérieur par les selles.

L'infection du veau nouveau-né par le Rotavirus ou le Coronavirus conduit, donc, à la destruction des entérocytes différenciés des villosités intestinales. Le Coronavirus bovin produit des lésions intestinales sévères et étendues, intéressant l'intestin grêle (jéjunum et iléon) et le colon. Le Rotavirus bovin se limite, quant à lui, à l'intestin grêle et plus particulièrement à la partie duodéno-jéjunale et provoque des lésions beaucoup moins importantes que celles dues au Coronavirus (Naylor, 2001 ; Radostits et al., 2001).

On observe souvent des villosités raccourcies, de longueur variée qui peuvent fusionner entre elles (Mebus et al., 1971). L'infection par le Coronavirus détruit les cellules sur toute la longueur des villosités, alors qu'une infection par le Rotavirus détruit uniquement les cellules du sommet (Massipn Schwers, Kaeckenback et Pastoret, 1983). Les cellules ainsi détruites sont remplacées par des cellules immatures dépourvues de bordure en brosse. Ces cellules sont réfractaires à l'infection, ce qui explique le caractère auto-limitant de ces viroses. Les lésions villositaires sont accrues lors d'infection simultanée par différents virus (Rotavirus et Coronavirus) ou lors d'entrave au renouvellement de l'épithélium villositaire suite à l'infection des glandes (BVDV).

En outre, l'infection par le Rotavirus se propage progressivement d'avant en arrière de telle sorte que, lorsque les segments postérieurs de l'intestin grêle sont atteints, les segments antérieurs sont déjà en voie de guérison (Mebus et al., 1969 (1971) ; Dubourguier, Gouet, Mandard, Contrepois et Bachelerie (1978) ; Tzipori (1981)). Ceci permet d'expliquer que des veaux âgés de quelques semaines excrètent des Rotavirus sans présenter de symptômes (Scherrer et al., 1976).

Pour les plus jeunes, après une période d'incubation de 24 à 36 heures, on observe un épisode diarrhéique plus ou moins intense suivant les animaux. La diarrhée est due à son commencement, à une diminution de l'absorption intestinale, les entérocytes étant, soit détruits, soit détournés de leurs fonctions physiologiques pour produire des virions. Pour ces deux raisons, c'est donc une diarrhée par malabsorption, maldigestion dont l'intensité et la gravité varient en fonction de l'étendue des lésions intestinales.

Il y a en plus accroissement de la perte massive d'eau dans le tube digestif par la présence excessive de lactose (par baisse de l'activité lactasique) et de substances osmotiquement actives, conséquence de l'abrasion des villosités. On sait, en outre, que les cellules différenciées ont une vie relativement courte. Elles sont remplacées par de nouvelles cellules provenant de la division active des cellules des cryptes qui migrent vers le sommet des villosités en acquérant de nouvelles propriétés en se différenciant.

En conséquence, la suite de la diarrhée pourrait résulter de plusieurs phénomènes :

- *- remplacement des entérocytes différenciés par un épithélium immature,
- *- surface d'absorption réduite due au raccourcissement et à la fusion des villosités,
- *- infection continue de l'intestin.

Le fait que le jeune animal soit plus sensible au pouvoir pathogène du virus peut, par ailleurs, s'expliquer par une pénétration plus facile du virus dans les cellules intestinales, encore capables d'absorber des macromolécules par pinocytose, et un renouvellement plus

lent des entérocytes chez l'animal nouveau-né que chez l'animal âgé (Scherrer et Laporte, 1983 ; Radostits et al., 2001).

Les infections à Rotavirus sont extrêmement fréquentes chez le veau nouveau-né comme le montrent les enquêtes qui ont pu être réalisées à ce jour.

La maladie causée par le Rotavirus seul est généralement bénigne mais l'intervention de ce virus à côté d'autres micro-organismes entéropathogènes peut aboutir à des syndromes graves, pouvant conduire à une déshydratation prononcée et à la mort de l'animal (Scherrer et Laporte, 1983).

En effet, une infection combinée du Rotavirus et d'E.coli entérotoxigène provoque une diarrhée beaucoup plus importante qu'une infection seule à Rotavirus et particulièrement pour les veaux de quelques jours, quand le Rotavirus produit normalement une maladie peu bénigne et que les veaux sont résistants aux E.C.E.T (Radostits, 2001). De même, une colibacillose provoquée par les E.C.E.T. peut être réalisée naturellement et expérimentalement sur des veaux de moins de deux jours et pas sur des veaux d'une semaine d'âge (Gouet et al., 1980). Les veaux diarrhéiques âgés de 3 jours doivent donc être infectés par Rotavirus et E.coli F₅ (Radostits et al., 2001). Il est évident que l'infection simultanée ou successive de l'infection par le Rotavirus permet à E.coli de coloniser les veaux plus âgés. Il y a donc une synergie entre les Rotavirus et E.coli entérotoxigène chez les veaux de plus de 2 jours, ce qui peut expliquer les diarrhées fatales chez le veau d'une semaine, qui normalement ne sont pas fatales avec une seule infection. Le Rotavirus accroît en fait la colonisation des E.coli. Par ailleurs, pour les veaux de 24 heures, une infection expérimentale simultanée de Rotavirus et E.coli résulte en une diarrhée sévère (Gouet et al., 1980). Dans ce cas, les effets semblent s'additionner et non s'amplifier (Radostits et al., 2001).

Quant au Coronavirus entérique bovin, il semble, dans bien des circonstances, entraîner une maladie sévère même en l'absence d'autres agents.

D- Déclenchement de la diarrhée :

La diarrhée est due le plus souvent à des modifications des mouvements d'eau et d'ions dont la muqueuse de l'intestin est normalement le support. En effet, on vient de voir que les agents pathogènes perturbent les fonctions de sécrétion et d'absorption de l'épithélium intestinal. En temps normal, l'absorption est quantitativement plus importante de telle sorte que la résultante (ou absorption nette) est en faveur de l'absorption (Bywater, 1977).

Les flux semi-directionnels de l'eau, l'un vers la lumière intestinale, l'autre vers le sang, représentent environ 100 litres par jour dans les deux directions chez un veau sain. Ces quantités apparaissent importantes si l'on compare à l'absorption nette qui est d'environ 4

litres par jour. Le veau diarrhéique présente une « sécrétion nette » d'eau au niveau intestinal mais cette perte fécale de 2 à 4 litres par jour est faible si on la compare aux mouvements semi-directionnels. Le déséquilibre ainsi montré entre ces transits d'eau provoquant l'apparition de la diarrhée, peut être rapporté à trois mécanismes : stimulation de la perte (sécrétion passive), stimulation de la sécrétion active, diminution de l'absorption.

D'autre part, ces mécanismes diffèrent selon l'agent étiologique en cause :

- L'accroissement de la perte passive d'eau peut être due soit à des facteurs circulatoires, conditionnés par des modifications de la muqueuse digestive rencontrées essentiellement dans les atteintes inflammatoires (salmonellose) soit à la présence d'une substance osmotiquement active dans le tube digestif (rotavirus, coronavirus) ;
- Les diarrhées par stimulation de la sécrétion intestinale sont principalement dues aux colibacilles entérotoxigènes. On a ainsi pu voir précédemment le mode d'action de l'entérotoxine thermostable qui augmente la sécrétion, ce qui va entraîner une accumulation d'électrolytes dans la lumière intestinale. L'augmentation de la pression osmotique, qui va en résulter, va provoquer un appel d'eau vers la lumière intestinale, d'où apparition de la diarrhée ;
- Le défaut d'absorption est surtout dû à un problème mécanique ; on observe une diminution de la surface absorbante en raison de l'abrasion des villosités intestinales. C'est le cas des rotaviroses et surtout des coronaviroses, les virus se répliquant dans les cellules des villosités qu'ils détruisent.

Par ailleurs, la diminution ou l'absence de l'absorption des électrolytes et des matières organiques (glucides, graisses et protéines) au niveau de la moitié supérieure de l'intestin grêle fournissent un milieu favorable au développement bactérien. Les bactéries vont donc coloniser l'intestin grêle en migrant vers les parties antérieures (Philips, Lewis et Knox, 1971 ; Philips, 1973 ; Philips et Case, 1980 ; Roussel et Kasari, 1990 ; Radostits et al., 2001) et transformer ces aliments en acides organiques et autres substances qui vont augmenter encore l'osmolarité de la lumière intestinale et, de ce fait, entraîner vers elle un mouvement supplémentaire d'eau et d'électrolytes (Saridakis, Gared, Vidotto et Guth, 1997; Naylor et al., 1997 ; Naylor, 2001).

Enfin, outre l'hypersécrétion, la diminution de l'absorption et le développement bactérien avec colonisation de l'intestin, on note fréquemment une hypomotilité intestinale. En effet, les études de Chartier (1981) ont permis de montrer que l'hypermotricité de la caillette accompagnant la prise alimentaire disparaissait au cours de la diarrhée, et qu'une

phase de repos moteur se prolongerait 1 à 3 heures. La vidange gastrique serait alors interrompue.

De même, la détérioration de la motricité intestinale est nette, avec une désorganisation des activités régulières puis avec, en permanence, une phase d'activité régulière.

Dans les cas bénins ou à évolution lente, le profil moteur peut redevenir normal après 12 à 24 heures de jeûne et n'est perturbé que lorsque l'animal est nourri. Par contre, en cas d'aggravation de la diarrhée, la motricité de l'intestin grêle, qui est de plus en plus faible, est souvent caractérisée par des progressions directes puis rétrogrades, favorisant ainsi le phénomène de stase gastrique. Lorsqu'il y a guérison, le retour progressif à une motricité normale précéderait généralement la disparition des signes cliniques (Verschour et Christensen, 1990 ; Snyder, 1991 ; Navetat et Rizet, 1995 ; Nappert, 1999).

On vient de montrer que la diarrhée peut se déclencher lorsqu'un agent pathogène vient modifier, d'une façon ou d'une autre, le fonctionnement normal de l'intestin. Ces dysfonctionnements engendrent anormalement une sécrétion nette d'eau et d'électrolytes au niveau intestinal. Ces perturbations affectent principalement les portions moyenne et basse de l'intestin grêle où s'effectuent les plus importants mouvements d'eau et d'électrolytes.

La réabsorption d'eau et de sodium peut augmenter considérablement au niveau du colon, mais ce mécanisme ne suffit pas à compenser les pertes issues de l'intestin grêle.

Ainsi, au cours de la diarrhée, les pertes hydriques et électrolytiques fécales sont évidemment très variables d'un sujet à l'autre et les conséquences sur l'organisme sont de degrés plus ou moins importants.

Il va falloir qualifier et quantifier ces perturbations digestives provoquées par la diarrhée et déterminer les conséquences métaboliques sur l'organisme et prendre les mesures thérapeutiques appropriées et en temps opportun (Lewis et Philip, 1979 ; Kari, 1990 ; Cebra et al., 1998 ; Constahle, Thomas et Boirasme, 2001).

CONCLUSION GENERALE

Les lourdes pertes économiques engendrées par les pathologies digestive et respiratoires des veaux ont considérablement augmenté au cours des dernières décennies à cause de l'introduction de méthodes intensives d'élevage pour les bovins de boucherie et pour la production laitière (Dawson et al., 1966 ; Woldehiwet et al., 1990[a, b]; Sayed et Ali, 2001).

Quoique plusieurs microorganismes soient capables d'induire les lésions finales du tractus respiratoire, une multitude de facteurs sont incriminés dans l'augmentation de l'incidence et de la sévérité des infections digestive et respiratoire (Yates, 1982 ; Tegtmeire et al., 1990 ; Castrucci et al., 1992). Ces facteurs comprennent les températures extrêmes, l'humidité relative, le changement de la ration alimentaire, le transport ainsi que, d'autres facteurs de stress.

La présente étude a été réalisée dans le but de déterminer l'influence de l'âge sur le développement et les variations quantitative et qualitative de l'appareil respiratoire supérieur et du tube digestif des veaux. Une approche de mise en évidence des antigènes viraux a porté sur le virus *Parainfluenza type 3 (PI-3)* et le *Rotavirus* dans les sécrétions nasales et les fèces.

Les résultats montrent que les veaux nés à des périodes différentes ont des comptes totaux de bactéries identiques. La flore bactérienne totale et les pourcentages pour une espèce bactérienne donnée varient considérablement d'un veau à un autre et d'un prélèvement à un autre pour un même veau. Malgré ces variations il y avait une indication claire d'une augmentation en relation avec l'âge dans la flore totale nasale et entérique.

Il faut également noter que cette étude a révélé qu'il n'y avait aucune corrélation entre les nombres de bactéries isolées des écouvillons nasaux et fécaux et l'apparition de signes cliniques pertinents de maladie. Ceci suggère que des nombres élevés d'agents potentiellement pathogènes dans les naseaux et les fèces ne sont d'une signification pathologique que lorsque cette augmentation coïncide avec une période de sensibilité élevée.

Les tractus respiratoire supérieur et digestif sont également colonisés par divers virus. Cette étude a montré que le *Rotavirus* et le virus *PI-3* sont fréquemment mis en évidence en ces sites. La méthode *ELISA* s'est révélée plus sensible que l'agglutination pour la mise en évidence des Rotavirus. L'immunofluorescence pratiquée pour la mise en évidence du virus *PI-3* est laborieuse qui exige un prélèvement de qualité.

Nos résultats ont montré que le nombre de veaux hébergeant le virus *PI-3* est inférieur à celui trouvé par d'autres chercheurs qui ont utilisé la méthode d'isolement direct du virus ou l'inhibition de l'hémagglutination.

Pour une meilleure compréhension des pathologies digestive et respiratoire, nous recommandons l'utilisation des infections expérimentales utilisant des combinaisons de virus tels que le PI-3 ou le virus respiratoire syncytial bovin et des bactéries telles que *Pasteurella haemolytica* ou *P. multocida* ; de même que l'association *Rotavirus-E. coli* ou *Coronavirus-E. coli*. Ces associations apportent plus de lumière sur la synergie virus-bactéries à des âges et dans des conditions d'environnement différents. Les prélèvements simultanés de l'environnement et des animaux pour l'isolement des virus et des bactéries permettront une meilleure compréhension de l'effet de l'environnement sur le développement et la sévérité des maladies respiratoires et digestives des veaux.

Résumé

Les effets de l'âge sur les variations quantitative et qualitative de la flore bactérienne nasale et fécale des veaux ont été étudiés par des prélèvements séquentiels effectués sur deux groupes de six veaux mâles de race Frisonne – Holstein.

Les veaux appartiennent à la même exploitation, donc soumis aux mêmes conditions de vie et d'élevage. Des écouillons nasaux et fécaux et des matières fécales ont été collectés à une semaine d'intervalle pour des études bactériologiques et virologiques.

L'appareil respiratoire supérieur est colonisé par des espèces bactériennes variées. Quoique les veaux soient d'âges différents, l'étude statistique n'a pas révélé de différences significatives pour toutes les espèces bactériennes. Néanmoins, on a noté une corrélation positive entre l'augmentation des unités bactériennes formant des colonies (UBFC) et l'âge dans les deux groupes de veaux.

E. coli K₉₉₊ ont été isolés dans les deux groupes d'âge mais leur nombre était plus élevé chez les veaux jeunes que chez les veaux âgés.

Le rotavirus a été mis en évidence par comparaison de deux méthodes qui sont l'agglutination au latex et l'ELISA utilisant les anticorps monoclonaux spécifiques du sérotype G₆. L'ELISA s'est révélé plus sensible que l'agglutination au latex car il a permis la détection des échantillons qui étaient négatifs à l'agglutination au latex .

Le virus Parainfluenza type – 3 (PI-3) a été étudié par la méthode d'immunofluorescence sur des écouillons nasaux . Les résultats détaillés sont discutés dans cette thèse.

Mots clés: diarrhée, Rotavirus, veaux, pathologie respiratoire, Pasteurelles, E.coli , Virus PI-III

Abstract

The effect of age on the quantitative and qualitative variation of the nasal and fecal bacterial flore have been studied by sequential samplings carried out on two groups of six male Friesan-Holstein calves.

The calves belong to the same farm, then submitted to the farm life and rearing conditions.

Nasal and fecal swabs and faeces have been collected at one-week intervals for bacteriological and virological studies.

The upper respiratory tract is colonized by various bacterial species. Although, calves have different ages the statistical analyses did not reveal significant differences for bacterial species. Nevertheless, we have noted a positive correlation between the increase in bacteria colony forming units (BCFU) and age in the two groups of calves.

E.coli K₉₉₊ has been isolated in the two groups of calves by in greater member in young ones at least at the start of diarrhoea in very young calves.

Rotavirus antigen has been detected in fecal matter using two methods I-e-latex agglutination and ELISA using monoclonal antibodies against G₆ serotype of rotavirus.

ELISA has shown to be more sensitive than latex agglutination because it was able to detect positive samples that were negative in latex agglutination.

The parainfluenza type-3 (PI-3) virus has been studied by the immunofluorescence technique using nasal swabs. The detailed results are discussed in this thesis.

Key words: diarrhoea, rotavirus, calves, respiratory diseases, pasteurilla, E.coli

:

."

."

.

.

:

.

.

.

.

3

: