

Année 2006



L'ASPIRATION TRANSTRACHEALE CHEZ LES
BOVINS : RÉALISATION ET INTERPRÉTATION

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRETEIL

Le

par

Stéphane, Emmanuel PIC

Né le 8 août 1971 à Nevers (Nièvre)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Sylvie CHASTANT

Maître de Conférences à l'ENVA

Assesseur : Renaud MAILLARD

Maître de Conférences à l'ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard
Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

<p>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur</p> <p>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain , Maître de conférences</p>	<p>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>-UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET CLINIQUE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Melle ABITBOL Marie, Maître de conférences</p> <p>-DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> <p>-DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié</p>
---	--

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHOLON Jean-Louis , Professeur

<p>- UNITE DE MEDECINE M. POUCHOLON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel M. PICCOT-CREZOLLET Cyrille, Maître de conférences contractuel</p> <p>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Melle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Melle LEDOUX Dorothée, Maître de conférences Contractuel (rattachée au DPASP)</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mlle RAVARY Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel</p> <p>-UNITE D'OPHTALMOLOGIE M. CLERC Bernard, Professeur* Melle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel</p> <p>-UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
--	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

<p>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences</p> <p>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : BIostatistiques M. SANAA Moez, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
--	--

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

A Monsieur le Président,

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A Madame Sylvie CHASTANT,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Pour son infinie patience, et l'intérêt porté à notre travail,

Sincères remerciements.

A Monsieur Renaud MAILLARD,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Pour avoir accepté le rôle d'assesseur de thèse,

Sincères remerciements.

A mes grand-parents,

qui m'ont transmis, chacun à leur manière, l'amour des vaches et de la vie rurale.

A mes parents,

qui m'ont permis de réaliser un de mes rêves d'enfant.

A Robin, Juliette, Pauline et Alexandra,

sans qui ce travail n'aurait pas encore vu le jour.

A Lucie, Delphine et Anthony,

toujours présents dans mon cœur.

A ma famille.

A mes amis.

L'ASPIRATION TRANSTRACHEALE: REALISATION ET INTERPRETATION

NOM et Prénom : PIC Stéphane

RESUME :

La technique d'aspiration transtrachéale est un examen complémentaire de plus en plus largement utilisé pour le diagnostic étiologique des agents responsables d'affection respiratoire chez les bovins. Elle s'utilise à la place ou en complément d'autres techniques telles que l'écouvillonnage nasopharyngé profond, le lavage bronchoalvéolaire ou plus simplement la sérologie.

La réalisation d'une aspiration transtrachéale est aisée, ne nécessite pas d'anesthésie et permet l'investigation de l'appareil respiratoire profond en offrant un prélèvement faiblement contaminé. Les diagnostics virologique et bactériologique sont précis et rapides. En revanche, le coût du cathéter est un obstacle à la réalisation de cet acte en routine et l'acheminement express de l'échantillon au laboratoire à la suite du prélèvement reste une contrainte.

Mots clés :

**Aspiration transtrachéale – Pathologie respiratoire – Bovin – Laboratoire – Virologie -
Bactériologie**

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Sylvie CHASTANT

Assesseur : Dr. Renaud MAILLARD

Adresse de l'auteur :

M. PIC Stéphane

Le Domaine Bleu

Le Bourg

58110 ALLUY

THE CATTLE TRANSTRACHEAL ASPIRATION : REALIZATION AND INTERPRETATION

SURNAME : PIC

Given name : Stéphane

SUMMARY :

The technique of transtracheal aspiration is a complementary examination more and more largely used for the etiologic diagnosis of the agents responsible for respiratory affection of cattle. It is used instead of or in complement of other techniques such as the deep nasopharyngeal swabbing, the bronchoalveolar washing or more simply the serology.

The realization of a transtracheal aspiration is easy, does not require anaesthesia and enables the investigation of the deep respiratory tract offering a slightly contaminated sample. The virologic and bacteriologic diagnosis are precise and fast. On the other hand, the cost of the catheter is a drawback to the everyday use of this act and the fast conveying of the sample to the laboratory remains an obstacle.

Keywords :

Transtracheal aspiration – Respiratory disease – Cattle – Laboratory – Virology - Bacteriology

Jury :

Président : Pr.

Director : Dr. Sylvie CHASTANT

Assessor : Dr. Renaud MAILLARD

Author's address:

Mr. PIC Stéphane

Le Domaine Bleu

Le Bourg

58110 ALLUY

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
I . ETIOLOGIE DES MALADIES RESPIRATOIRES DES BOVINS	13
1 . LES PRINCIPAUX VIRUS ASSOCIES AUX TROUBLES RESPIRATOIRES DES BOVINS	13
1.1 . Le virus respiratoire syncytial bovin	13
<i>1.1.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	13
<i>1.1.2 . Pouvoir pathogène</i>	14
1.1.2.1 . Reproduction expérimentale	14
1.1.2.2 . Pathologie spontanée	14
<i>1.1.3 . Epidémiologie</i>	15
1.1.3.1 . Période d'incubation	15
1.1.3.2 . Sources et réservoirs de virus	15
1.1.3.3 . Mode de contamination	15
1.1.3.4 . Facteurs sensibilisants	15
<i>1.1.4 . Tableau clinique</i>	16
1.2 . Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine	17
<i>1.2.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	17
<i>1.2.2 . Pouvoir pathogène</i>	18
1.2.2.1 . Reproduction expérimentale	18
1.2.2.2 . Pathologie spontanée	18
<i>1.2.3 . Epidémiologie</i>	19
1.2.3.1 . Période d'incubation	19
1.2.3.2 . Sources et réservoirs de virus	19
1.2.3.3 . Mode de contamination	19
1.2.3.4 . Facteurs sensibilisants	20

1.2.4 . <i>Tableau clinique</i>	20
1.3 . Le virus parainfluenza 3	22
1.3.1 . <i>Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	22
1.3.2 . <i>Pouvoir pathogène</i>	22
1.3.2.1 . <i>Reproduction expérimentale</i>	22
1.3.2.2 . <i>Pathologie spontanée</i>	22
1.3.3 . <i>Aspects épidémiologiques</i>	23
1.4 . Le virus de la maladie des muqueuses	23
1.4.1 . <i>Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	24
1.4.2 . <i>Pouvoir pathogène</i>	24
1.4.2.1 . <i>Reproduction expérimentale</i>	24
1.4.2.2 . <i>Pathologie spontanée</i>	24
1.4.3 . <i>Epidémiologie</i>	25
1.4.3.1 . <i>Période d’incubation</i>	25
1.4.3.2 . <i>Sources et réservoirs de virus</i>	25
1.4.3.3 . <i>Mode de contamination</i>	25
1.4.3.4 . <i>Facteurs sensibilisants</i>	26
1.4.4 . <i>Tableau clinique</i>	26
1.5 . Le coronavirus	27
1.5.1 . <i>Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	27
1.5.2 . <i>Pouvoir pathogène</i>	27
1.5.2.1 . <i>Reproduction expérimentale</i>	27
1.5.2.2 . <i>Pathologie spontanée</i>	27
1.5.3 . <i>Aspects épidémiologiques</i>	28
1.6 . Les Adenovirus	28
1.6.1 . <i>Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	28
1.6.2 . <i>Pouvoir pathogène</i>	28
1.6.2.1 . <i>Reproduction expérimentale</i>	28
1.6.2.2 . <i>Pathologie spontanée</i>	28
1.6.3 . <i>Aspects épidémiologiques</i>	29

2 . LES PRINCIPAUX AGENTS BACTERIENS ASSOCIES AUX TROUBLES RESPIRATOIRES DES BOVINS	29
2.1 . Le genre Pasteurella	30
2.1.1 . <i>Mannheimia haemolytica</i>	30
2.1.1.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques	30
2.1.1.2 . Pouvoir pathogène	30
2.1.1.2.1 . Reproduction expérimentale	31
2.1.1.2.2 . Pathologie spontanée	31
2.1.1.3 . Epidémiologie	32
2.1.1.3.1 . Période d’incubation	32
2.1.1.3.2 . Sources et réservoirs de germes	32
2.1.1.3.3 . Mode de contamination	33
2.1.1.3.4 . Facteurs sensibilisants	33
2.1.1.4 . Tableau clinique	33
2.1.2 . <i>Pasteurella multocida</i>	34
2.1.2.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques	34
2.1.2.2 . Pouvoir pathogène	34
2.1.2.2.1 . Reproduction expérimentale	34
2.1.2.2.2 . Pathologie spontanée	34
2.1.2.3 . Aspects épidémiologiques	34
2.2 . Les mycoplasmes	35
2.2.1 . <i>Mycoplasma bovis</i>	35
2.2.1.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques	35
2.2.1.2 . Pouvoir pathogène	35
2.2.1.2.1 . Reproduction expérimentale	35
2.2.1.2.2 . Pathologie spontanée	36
2.2.1.3 . Aspects épidémiologique	37
2.2.1.3.1 . Période d’incubation	37
2.2.1.3.2 . Sources et réservoirs de germes	37
2.2.1.3.3 . Mode de contamination	37
2.2.1.4 . Tableau clinique	38
2.2.2 . <i>Mycoplasma mycoides spp mycoides</i>	38

2.2.3 . <i>Mycoplasmes à pouvoir pathogène occasionnel</i>	39
2.2.3.1 . <i>Mycoplasma dispar</i>	39
2.2.3.2 . <i>Ureaplasma diversum</i>	39
2.3 . Les salmonelles	40
2.3.1 . <i>Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	40
2.3.2 . <i>Pouvoir pathogène</i>	40
2.3.3 . <i>Aspects épidémiologiques</i>	40
2.3.4 . <i>Tableau clinique</i>	41
2.4 . <i>Histophilus somni</i>	42
2.4.1 . <i>Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	42
2.4.2 . <i>Pouvoir pathogène</i>	42
2.4.2.1 . <i>Reproduction expérimentale</i>	42
2.4.2.2 . <i>Pathologie spontanée</i>	42
2.4.3 . <i>Aspects épidémiologiques</i>	43
2.4.4 . <i>Tableau clinique</i>	43
2.5 . Les bactéries Gram +	44
2.5.1 . <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	44
2.5.2 . <i>Streptococcus pneumoniae</i>	44
3 . LES ASSOCIATIONS D'AGENTS INFECTIEUX EN PATHOLOGIE RESPIRATOIRE CHEZ LES BOVINS	45
4 . LA COMPOSANTE PARASITAIRE DES TROUBLES RESPIRATOIRES DES BOVINS	47
4.1 . <i>Dictyocaulus viviparus</i>	47
4.1.1 . <i>Taxonomie – Principales caractéristiques</i>	47
4.1.2 . <i>Pouvoir pathogène</i>	47
4.1.3 . <i>Epidémiologie</i>	48
4.1.3.1 . <i>Sources et réservoirs de parasites</i>	48
4.1.3.2 . <i>Mode de contamination</i>	48
4.1.3.3 . <i>Facteurs sensibilisants</i>	48
4.1.4 . <i>Tableau clinique</i>	49
4.2 . Les autres helminthoses respiratoires	49

II . REALISATION DE L'ASPIRATION TRANSTRACHEALE	51
1 . RAPPELS ANATOMIQUES	51
1.1 . L'arbre trachéo-bronchique	51
<i>1.1.1 . La trachée</i>	51
<i>1.1.2 . Les bronches</i>	53
1.2 . Poumons et plèvre	55
<i>1.2.1 . Les poumons</i>	55
<i>1.2.2 . La plèvre</i>	58
2 . LES DIFFERENTES METHODES D'ASPIRATION TRANSTRACHEALE	58
2.1 . Ebauche d'une technique d'ATT adaptée aux bovins par Mac Laughlin et Miske	58
<i>2.1.1 . Matériel</i>	59
<i>2.1.2 . Méthode</i>	59
2.2 . Technique de Viso, Espinasse et Laval	60
<i>2.2.1 . Matériel</i>	60
<i>2.2.2 . Méthode</i>	62
2.3 . Technique de Zundel, et al	63
<i>2.3.1 . Matériel</i>	63
<i>2.3.2 . Méthode</i>	64
2.4 . L'ATT telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui	64
<i>2.4.1 . Matériel</i>	64
<i>2.4.2 . Méthode</i>	65
2.4.2.1 . Contention et positionnement de l'animal	65
2.4.2.2 . Préparation	66
2.4.2.3 . Ponction et pose du cathéter	66
2.4.2.4 . Lavage trachéobronchique	66
2.4.2.5 . Conditionnement du prélèvement	68
<i>2.4.3 . Quelques conseils pratiques</i>	68

III . DEVENIR DES PRELEVEMENTS D'ASPIRATION

TRANSTRACHEALE AU LABORATOIRE

71

1 . TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON AU LABORATOIRE

71

1.1 . Etude cytologique

71

1.1.1 . Préparation de l'échantillon

72

1.1.2 . Méthode de lecture

72

1.1.3 . Cytologie chez animal sain

72

1.1.4 . Modifications cytologiques observées sur un animal malade

73

1.2 . Etude virologique

75

*1.2.1 . Isolement du virus sur culture cellulaire et identification
des particules virales isolées sur cellules*

75

1.2.1.1 . Méthode d'isolement sur culture cellulaire

75

1.2.1.2 . Recherche de l'effet cytopathogène

76

1.2.1.3 . Méthodes d'identification des particules virales
isolées sur cellules

78

1.2.1.3.1 . Séroneutralisation

78

1.2.1.3.2 . Immunochimie

78

1.2.2 . Recherche des antigènes viraux par immunochimie

80

1.2.3 . Recherche de l'ADN spécifique

81

1.3 . Etude bactériologique

82

1.3.1 . Milieux de cultures

82

1.3.2 . Identification des bactéries

83

1.3.3 . Le cas particulier des mycoplasmes

84

1.3.3.1 . Mise en culture

84

1.3.3.2 . Identification des mycoplasmes

85

1.4 . Réalisation d'un antibiogramme

88

1.4.1 . Principe général (60)

88

1.4.2 . Méthodologie

88

1.4.2.1 . Epreuve de sensibilité

88

1.4.2.2 . Interprétation de l'antibiogramme

91

2 . INTERPRETATION DES RESULTATS DE LABORATOIRE	92
2.1 . Interprétabilité d'un test	92
2.1.1 . <i>Importance de l'examen clinique</i>	92
2.1.2 . <i>Commémoratifs complets</i>	93
2.1.3 . <i>Choix des animaux prélevés</i>	96
2.1.4 . <i>Bonne qualité du prélèvement</i>	97
2.2 . Interprétation d'un résultat négatif	97
2.2.1 . <i>Résultat bactériologique négatif</i>	97
2.2.2 . <i>Résultat virologique négatif</i>	98
2.3 . Interprétation d'un résultat positif	98
2.3.1 . <i>Résultat bactériologique positif</i>	98
2.3.2 . <i>Résultat virologique positif</i>	99
IV. QUAND PRATIQUER UNE ASPIRATION	
TRANSTRACHEALE ?	101
1. LES ALTERNATIVES A L'ASPIRATION TRANSTRACHEALE	101
1.1 . Ecouvillonnage nasopharyngé profond	101
1.1.1 . <i>Matériel spécifique</i>	101
1.1.2 . <i>Méthode</i>	102
1.1.3 . <i>Utilisation du prélèvement</i>	102
1.2 . Lavage bronchoalvéolaire	102
1.2.1 . <i>Matériel spécifique</i>	102
1.2.2 . <i>Méthode</i>	103
1.2.3 . <i>Utilisation du prélèvement</i>	103
1.3 . Ponction sanguine – Sérologie	104
1.3.1 . <i>Protocole</i>	104
1.3.2 . <i>Utilisation du prélèvement</i>	104
2 . INTERETS ET LIMITES DES DIFFERENTS MODES	
DE PRELEVEMENT	105
2.1 . La facilité de prélèvement	105
2.2 . Le coût	106
2.3 . Les techniques de laboratoire	108
2.4 . Intérêts et limites biologiques	109
2.4.1 . <i>La pathogénie des germes infectieux</i>	109

2.4.2 . <i>La présence de flore commensale</i>	109
2.4.3 . <i>Les anticorps maternels et vaccinaux</i>	109
3 . DISCUSSION	110
3.1 . Quel prélèvement choisir ?	110
3.2 . La place de l'aspiration transtrachéale dans la médecine vétérinaire aujourd'hui	115
3.2.1 . <i>L'intérêt médical de l'ATT</i>	115
3.2.2 . <i>L'intérêt prophylactique de l'ATT</i>	116
3.2.3 . <i>L'intérêt de l'ATT dans le contrôle de l'antibiothérapie</i>	116
3.2.4 . <i>L'intérêt de l'ATT dans la recherche</i>	117
3.2.5 . <i>L'intérêt de l'ATT en santé publique</i>	117
3.2.6 . <i>L'intérêt intellectuel de l'ATT</i>	118
CONCLUSION	119
BIBLIOGRAPHIE	121

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Caractéristiques semi-quantitatives des populations cellulaires présentes dans les liquides d'aspiration transtrachéale dans quelques cas d'affections broncho-pulmonaires	74
Tableau 2 : Nature et valeur des examens de laboratoire dans le diagnostic étiologique d'une pathologie respiratoire	87
Tableau 3 : Sémiologie des affections respiratoires	94
Tableau 4 : Coûts relatifs des analyses de laboratoires	107
Tableau 5 : Avantages et limites des différentes techniques de prélèvements sur animal vivant dans le cadre d'affection respiratoire	114

LISTE DES FIGURES:

Figure 1 : Trachée de bœuf avec ses rapports anatomiques principaux	52
Figure 2 : Voies aériennes de bovin : arbre bronchique	54
Figure 3 : Poumon gauche de bœuf	56
Figure 4 : Poumon droit de bœuf	57
Figure 5 : Montage pour un prélèvement par aspiration transtrachéale	61
Figure 6 : Contention d'un taurillon	65
Figure 7 : Ponction de la trachée	67
Figure 8 : Trajet du cathéter et injection du soluté	67
Figure 9 : Principales étapes de réalisation d'un antibiogramme par la méthode de diffusion	90

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

BHV1 : bovine herpes virus de type 1.

BPIE : broncho-pneumonie infectieuse enzootique.

BVDV : Bovine Viral Diarrhoea Virus.

ECP : effet cytopathogène.

ELISA : Enzym Linked Immuno Sorbent Assay.

ENP : écouvillonnage nasopharyngé.

IETS : international embryo transfer society

IFD : immunofluorescence directe.

IFI : immunofluorescence indirecte.

IgG : immunoglobuline de classe G.

IgM : immunoglobuline de classe M.

IPA : immuno-peroxydase assay.

IPV : Infectious Pustular Vulvovaginitis (exanthème coïtal des bovines).

LBA : lavage broncho-alvéolaire.

LNPB : Laboratoire National de Pathologie Bovine.

LTB : lavage trachéo-bronchique.

LVD : laboratoire vétérinaire départemental.

PBS : Phosphate Buffer Saline.

PCR : polymerase chain reaction.

PI3 : virus parainfluenza de type 3.

VRSB : virus respiratoire syncytial bovin.

VRSH : virus respiratoire syncytial humain.

INTRODUCTION

Dans les années 70, une nouvelle forme d'élevage du veau, de caractère intensif, se développait, favorisant l'éclosion et l'explosion d'une pathologie alors mal maîtrisée, que d'aucuns ont dénommée « pathologie du rassemblement » et reconnue aujourd'hui sous le terme de Bronchopneumonie Infectieuse Enzootique ou BPIE. Il a été démontré que la gravité du complexe Bronchopneumonie Infectieuse Enzootique est liée à plusieurs facteurs de risque : stress, techniques d'élevage, exposition à de nombreux agents pathogènes.

Aujourd'hui encore les maladies respiratoires dominent la pathologie dans les ateliers de veaux de boucherie et dans les unités d'engraissement de jeunes bovins, mais également dans les élevages traditionnels naisseurs allaitants.

Le poids économique élevé des pertes subies par l'élevage bovin à cause des maladies respiratoires justifie les nombreuses études effectuées sur ce sujet ces dernières décennies en vue de définir le rôle des divers agents pathogènes répertoriés, d'élaborer des traitements et une politique préventive efficaces. C'est dans ce cadre que se situe notre travail.

Un éleveur ne sollicite plus, aujourd'hui, l'appui du vétérinaire pour un cas de maladie respiratoire isolé. En effet, la situation économique du monde agricole est de plus en plus précaire et aléatoire. Les règles imposées par la politique agricole commune variant au gré des saisons, de nombreux postes de dépenses sont revus à la baisse par les éleveurs : les frais vétérinaires en font partie.

Cependant, les affections respiratoires se manifestent souvent sous la forme d'une pathologie de groupe et l'éleveur, inquiet, souhaite connaître l'étiologie des troubles et, surtout, la parade correspondante. En effet, un contrôle efficace de ces affections repose sur une identification précise de leurs causes. Le caractère peu évocateur des symptômes ou des lésions rend cependant le diagnostic causal spécifique très difficile, voire impossible, à partir des seules bases épidémiologiques et cliniques. Le recours aux examens complémentaires s'avère donc nécessaire dans de nombreux cas.

Dans ce contexte, le vétérinaire doit apporter une réponse rapide et efficace. Le praticien dispose de différents examens complémentaires visant à réaliser des prélèvements chez l'animal vivant dans le cadre de la recherche étiologique d'une affection respiratoire.

L'aspiration trans-trachéale est l'un de ces examens. Elle permet de recueillir, par le biais d'un lavage des voies respiratoires profondes, des sécrétions contenant du mucus et des sécrétions bronchiques, des cellules et des agents infectieux, ainsi que diverses molécules (protéines inflammatoires, immunoglobulines...) présentes dans la lumière de la portion terminale de la trachée de l'animal.

Ainsi, à partir de cet échantillon, envoyé à un laboratoire d'analyses biologiques, on réalise des examens cytologiques, virologiques et bactériologiques pour la détermination de l'agent étiologique d'une affection trachéale, bronchique, ou pulmonaire. Il est également possible de mettre en évidence la présence de larves de parasites de l'appareil respiratoire.

Dans un premier temps, nous allons survoler l'éventail des germes intervenant dans les maladies respiratoires des bovins. Puis nous étudierons l'évolution de la technique d'aspiration transtrachéale depuis ses prémices jusqu'à la standardisation de la méthode utilisée aujourd'hui. Nous pourrions alors évoquer le devenir du prélèvement d'ATT au laboratoire d'analyses. Nous terminerons cette étude en discutant le bien fondé de l'aspiration transtrachéale par rapport à la ponction sanguine, à l'écouvillonnage nasopharyngé et au lavage bronchoalvéolaire, et en parcourant ses différents champs d'application.

I . ETIOLOGIE DES MALADIES RESPIRATOIRES DES BOVINS

Après de brefs rappels taxonomiques concernant chacun des agents pathogènes étudiés, nous décrirons leur pouvoir pathogène, leur épidémiologie et les manifestations cliniques correspondant à chaque maladie associée.

1 . LES PRINCIPAUX VIRUS ASSOCIES AUX TROUBLES RESPIRATOIRES DES BOVINS

Si l'implication des bactéries dans les troubles respiratoires est connue depuis longtemps chez les bovins, il a fallu attendre la fin des années 50 pour que le rôle des virus dans les pneumopathies aiguës soit suspecté.

1.1 . Le virus respiratoire syncytial bovin

Le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) est habituellement considéré comme un agent pathogène majeur des maladies respiratoires bovines (107). Le premier isolement du VRSB, chez un bovin adulte atteint de troubles respiratoires, a eu lieu en 1967 (94).

1.1.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRSB) est très proche du Virus Respiratoire Syncytial Humain (VRSH) qui appartient au même genre *Pneumovirus*, de la sous-famille des *Pneumovirinae*, de la famille des *Paramyxoviridae*. C'est un virus à ARN monocaténaire linéaire de polarité négative (107). Le génome est constitué d'environ 15000 nucléotides et code 8 protéines structurales et non-structurales (94).

1.1.2 . Pouvoir pathogène

1.1.2.1 . Reproduction expérimentale

BRYSON et al. (12) ont inoculé par voie intratrachéale et intranasale du VRSB à des veaux nouveau-nés. Ils ont pu reproduire des troubles respiratoires sur 50 à 60 % des animaux. Toutefois, les manifestations cliniques et les modifications histologiques lors de ces inoculations sont moins manifestes que celles observées en pathologie spontanée.

Des troubles respiratoires ont pu être reproduits, également, sur de jeunes bovins à l'aide d'une souche d'origine humaine, malgré quelques différences antigéniques entre le VRSH et le VRSB (43).

1.1.2.2 . Pathologie spontanée

L'infection primaire ne semble provoquer que des altérations pulmonaires réversibles qui rendent simplement l'animal plus fragile et plus sensible aux surinfections bactériennes (71). Lors du second passage, le virus se multiplie dans l'épithélium des portions proximales et distales du tractus respiratoire mais ne pénètre pas profondément dans le tissu ; il n'y a pas de virémie. L'infection déclenche la production et la libération de médiateurs inflammatoires comme des cytokines et des leucotriènes. Il en résulte l'arrivée dans l'espace alvéolaire de quantités variables de neutrophiles, lymphocytes et éosinophiles. Bien que la réponse inflammatoire résultante vise à la destruction des cellules infectées et la réparation du tissu lésé, une telle réaction inflammatoire dans les poumons peut entraîner une obstruction des voies aériennes et une insuffisance respiratoire (94).

Ainsi, à l'autopsie, on remarque une densification de la région cranio-ventrale des poumons et un emphysème interlobulaire sous-pleural en zone diaphragmatique (95). Microscopiquement, on observe des lésions de pneumonie interstitielle avec une bronchiolite (21).

1.1.3 . Epidémiologie

1.1.3.1 . Période d'incubation

La propagation rapide du virus à travers un cheptel résulte de la courte période d'incubation qui est de trois à cinq jours (4).

1.1.3.2 . Sources et réservoirs de virus

Il est présent dans les cheptels bovins du monde entier. En France, 50 p.cent des bovins adultes sont séropositifs vis-à-vis de ce virus (47).

Le virus est présent dans l'environnement, excrété par les animaux contaminés lors de l'expiration (47). Lors d'infection expérimentale chez le veau, l'excrétion virale a pu être observée pendant 4 à 10 jours après l'inoculation (107).

Mais ce sont les bovins adultes qui sont considérés comme les principaux réservoirs de VRSB ; les veaux sont plus vraisemblablement infectés au contact des sécrétions nasales et des virus aérosolisés provenant d'animaux adultes ou d'autres veaux. Les autres espèces ne sont pas considérées comme importantes pour la transmission du VRSB (94).

1.1.3.3 . Mode de contamination

Le virus se transmet d'animal à animal par contacts directs mais aussi par le biais de différents vecteurs passifs : particules en suspension dans l'air ou apport de matériel contaminé à proximité des naseaux. La voie d'inoculation est le tractus respiratoire (47).

L'existence d'infection congénitale par le VRSB n'a jamais été rapportée (107).

1.1.3.4 . Facteurs sensibilisants

L'incidence saisonnière de l'infection au VRSB, typiquement en automne et en hiver, suggère que les facteurs climatiques participent à l'apparition de la maladie. Ainsi, les températures basses et un taux d'humidité important peuvent augmenter la longévité des virus aérosolisés (94).

Au sein d'une population avec des contacts au hasard, la transmission du virus paraît directement liée à la densité de la population et non au nombre d'animaux (107).

Bien sûr, l'introduction d'animaux au sein d'un troupeau représente un risque majeur d'une infection au VRSB et des troubles respiratoires associés. Ces animaux peuvent introduire le virus dans l'élevage ou, s'ils sont séronégatifs, accroître le nombre d'animaux sensibles et fragiliser l'ensemble du cheptel (107).

Les jeunes animaux sont les plus sévèrement touchés. Les veaux de boucherie et les jeunes veaux à viande de 3 à 6 mois, soumis au stress de transport et à l'allotement en stabulation, sont particulièrement prédisposés. De plus, les veaux n'ayant pas absorbé convenablement leur colostrum sont des individus à risque. Les primo infections chez les bovins adultes peuvent également induire de graves maladies respiratoires, mais dans les secteurs à population bovine dense, la plupart des adultes ne développent pas de signes cliniques après une infection au VRSB car ils ont déjà acquis une résistance à la maladie, suite aux infections précédentes (94).

L'évolution clinique est plus grave chez les animaux de races à viande comme le Blanc Bleu Belge ou les animaux issus de croisement avec une race à viande (94).

1.1.4 . Tableau clinique

La forme aiguë de la maladie peut évoluer en deux phases. La première correspond à l'apparition brutale d'un syndrome respiratoire de type grippal avec un jetage important, une conjonctivite entraînant un larmoiement, une toux sèche, persistante, accompagnée d'une tachypnée et d'une hyperthermie pouvant atteindre 42 °C. L'excrétion virale est alors maximale. Chez les jeunes animaux (jusqu'à l'âge de 18 mois), une aggravation de la maladie (deuxième phase) peut survenir très rapidement après le syndrome grippal ou plusieurs jours à plusieurs semaines plus tard. La détresse respiratoire est alors aiguë (dyspnée importante, respiration de type abdominale, encolure tendue avec plaintes à l'expiration). On observe du ptyalisme avec une salive spumeuse parfois teintée de sang. L'animal est anorexique, souvent constipé. Les muqueuses sont cyanosées. Parfois, on note la présence d'un emphysème sous-

cutané dans la région de l'épaule et de l'encolure. Le taux de mortalité peut atteindre 30 p. cent (11).

Les lésions de l'épithélium cilié facilitent le passage des bactéries dans les voies respiratoires distales. Aussi, on observe assez souvent des infections bactériennes secondaires, avec un jetage muco-purulent (94).

Chez les animaux plus âgés ou lors de réinfections, une forme atténuée peut être rencontrée (jetage séreux peu abondant, toux sèche, hyperthermie), évoluant en une à deux semaines vers la guérison (11).

1.2 . Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine

Déjà signalée en 1950 au Colorado sous les noms de « nez rouge », de « pneumonie de la poussière » ou encore de « rhinotrachéite nécrotique », la rhinotrachéite infectieuse bovine ne reçoit cette dénomination qu'en 1955. Madin isolera le virus responsable en 1956. On s'aperçoit alors qu'il s'agit du virus de l'exanthème coïtal des bovins décrit en Europe à la fin du XIXème siècle. Cette maladie a, depuis, pris le nom d'« Infectious Pustular Vulvovaginitis » (IPV) aux Etats-Unis. Le virus a été isolé en France en 1967 (23).

1.2.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

L'herpès virus bovin de type 1, BHV1 (ou virus IBR, infectious bovine rhinotracheitis) appartient au groupe des Herpesvirus, famille des *Herpesviridae*, sous-famille des *Alphaherpesvirinae* (103). Sa taille est de 150 à 200 nm (47). C'est un virus à ADN bicaténaire qui comporte 21 protéines de structure dont 10 sont glycosylées (69). Il possède un tropisme pour les cellules épithéliales, les cellules mononuclées sanguines et les neurones (103).

1.2.2 . Pouvoir pathogène

1.2.2.1 . Reproduction expérimentale

Expérimentalement, des troubles respiratoires peuvent être reproduits sur des veaux nouveaux nés ou des taurillons en les inoculant avec du BHV-1 par voie intranasale, intratrachéale ou en aérosol (36). Toutefois, en fonction des souches utilisées, les troubles cliniques sont d'intensité variable (70).

1.2.2.2 . Pathologie spontanée

Lors d'une infection, le virus se multiplie intensément au niveau de la porte d'entrée, c'est-à-dire au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire (tractus respiratoire supérieur) ou de la muqueuse génitale (103). On aboutit à une lyse cellulaire avec destruction de l'épithélium et formation d'inclusions intranucléaires (69).

L'infection primaire provoque une virémie transitoire qui peut entraîner chez l'adulte des localisations secondaires (tractus digestif, fœtus, ovaires, mamelle). Le nouveau-né peut succomber à une généralisation de l'infection s'il n'est pas protégé par l'immunité colostrale.

En se multipliant au niveau de la muqueuse, le virus contamine les nerfs périphériques et remonte par voie axonale rétrograde jusqu'au ganglion nerveux régional. C'est dans les cellules nerveuses du ganglion trijumeau ou du ganglion sacré que le BHV1 s'installe à l'état latent.

Enfin, le virus peut se transmettre d'une cellule à l'autre sans phase extra-cellulaire et donc à l'abri des anticorps spécifiques, comme lors de réactivation d'un virus latent chez un animal immunisé (103).

Cet état latent peut être rompu et le virus débute de nouveaux cycles de multiplication dans l'organisme. Ce processus est provoqué par divers stimuli : transport, parturition, injection de glucocorticoïdes (dexaméthasone), surinfection par un autre virus (parainfluenza 3), infestation parasitaire. La réactivation virale conduit généralement à une réexcrétion du BHV1, avec peu ou pas de signes cliniques de la maladie (102).

1.2.3 . Epidémiologie

1.2.3.1 . Période d'incubation

Dans les conditions naturelles, la durée d'incubation est de 2 à 6 jours (23). Cette durée dépend de la quantité de virus, de la voie d'inoculation et d'autres facteurs relatifs à la pathogénicité de la souche (47).

1.2.3.2 . Sources et réservoirs de virus

Les bovins sont considérés comme le réservoir principal du virus BHV1, dans toutes les parties du globe. D'autres ruminants ont été décrits comme sensibles, notamment les cervidés, mais les conséquences de leur infection sont négligeables (47).

En primo-infection ou lors de réexcrétion après réactivation, le virus est présent en abondance dans le jetage nasal qui représente la source majeure d'infection. On le retrouve également dans les sécrétions oculaires et génitales du bovin infecté (102 ; 113).

L'apparition de l'infection dans un élevage sain est le plus souvent liée à l'introduction d'un animal en phase de latence (47). En effet, tout animal infecté peut devenir porteur latent pendant une période assez longue, pouvant atteindre 578 jours (98). Il est susceptible, à tout moment, de réexcréter du virus infectieux, avec pas ou peu de signes cliniques, et de contaminer ainsi les autres animaux. Ensuite, la présence d'animaux porteurs latents est l'élément essentiel de la persistance du virus au sein d'un troupeau (102).

1.2.3.3 . Mode de contamination

Le BHV1 se transmet essentiellement par contact direct de « naseau à naseau » ou sur de courtes distances par aérosolisation de gouttelettes de mucus nasal lors d'épisodes de toux et éternuements. Il est présent dans le jetage nasal dès 24 heures après l'infection (102). La période d'excrétion primaire varie de 10 à 16 jours, avec un pic d'excrétion entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour après infection (103). Aussi on n'observe pas d'épidémie brutale mais plutôt une propagation de proche en proche dans une étable (102). Et il est rare que le virus passe d'un lot à l'autre (47).

Le sperme et les sécrétions vaginales sont virulents dans les formes génitales ; le coït et, plus rarement, l'insémination artificielle peuvent être à l'origine de contamination (47).

Le virus peut également être transmis par l'intermédiaire du matériel ou des vêtements souillés par des sécrétions nasales.

En ce qui concerne le transfert embryonnaire, il y a très peu de risque de transmission virale si les recommandations de l'IETS sont respectées (102).

Enfin, il est important de noter que l'excrétion du virus BHV1 est fonction de l'immunité acquise de l'animal. Plus il est immunisé contre ce virus, moins il risque d'excréter lors de stimulus (45).

1.2.3.4 . Facteurs sensibilisants

La rhinotrachéite infectieuse bovine est une maladie virale à allure sporadique. Des foyers sont régulièrement diagnostiqués durant la période hivernale.

La maladie atteint les animaux de tout âge mais les plus sensibles semblent être les jeunes de 10 à 15 mois dans les ateliers d'engraissement (35). Le veau porteur d'anticorps colostraux est protégé de la maladie, mais pas de l'infection virale. Il devient sensible à la maladie vers l'âge de 3-4 mois. (102). On constate que la mortalité est beaucoup plus élevée chez les veaux de moins de deux semaines que chez les adultes (47).

La morbidité et la mortalité varient beaucoup en fonction des souches virales en cause et de l'état immunitaire des animaux (23).

1.2.4 . *Tableau clinique*

La rhinotrachéite infectieuse bovine est la forme respiratoire de l'infection par le virus BHV-1. Ce virus est également responsable d'encéphalite, de conjonctivite, d'avortement, de métrite après césarienne, d'une forme systémique mortelle en période néonatale et d'une forme génitale, la vulvovaginite pustuleuse infectieuse, suivant sa voie d'entrée dans l'organisme et son sous-type viral (47 ; 102).

La maladie débute par une forte hyperthermie (40-42°C) qui se maintient pendant 3 à 4 jours (23). Les animaux sont abattus, leur appétit est diminué et la production de lait chute de manière brutale (102).

Les signes locaux apparaissent ensuite. On relève fréquemment une hypersalivation très abondante avec des dépôts spumeux autour de la bouche. Un jetage abondant bilatéral se manifeste alors sous forme de longues chandelles séreuses puis muco-purulentes avec formation de croûtes qui obstruent les cavités nasales. La muqueuse pituitaire est congestionnée et peut être le siège de foyers de nécrose et d'ulcères (23). Une toux grasse et des éternuements se produisent ainsi qu'un larmolement et une congestion des muqueuses autour de l'œil (102). Les troubles fonctionnels de la respiration se traduisent par des râles audibles à distance et du cornage. Parfois, l'animal respire la bouche ouverte (23).

Le stade aigu de la maladie dure 5 à 10 jours et la plupart des animaux guérissent avec seulement une perte de poids et un cornage temporaire. La mort est généralement due à des complications bactériennes entraînant des broncho-pneumonies étendues, de l'emphysème pulmonaire, des laryngites nécrotiques, etc (23). On remarque, à ce sujet, que la présence de BHV1 accroît la sensibilité à *Pasteurella haemolytica* en modifiant l'activité des macrophages alvéolaires (31).

Les symptômes respiratoires sont les plus fréquents mais on observe également des avortements lors d'épidémie d'IBR et de la mortalité embryonnaire chez la femelle infectée précocement après la saillie. L'infection de vaches durant le dernier trimestre de la gestation peut conduire, en plus de l'avortement, à des mortalités néo-natales et à des cas de mortalité de veaux dans les 12 jours qui suivent la naissance.

Chez les veaux, la maladie débute souvent à l'âge de 3 ou 4 jours et est rapidement mortelle. Les veaux présentent de la toux, du jetage nasal, du ptyalisme, de l'épiphora, de la broncho-pneumonie, de la diarrhée catarrhale non hémorragique, des ulcérations au niveau de la muqueuse digestive et de l'hyperthermie. La forme respiratoire pure est ainsi rarement décrite chez le nouveau-né (102).

Le BHV1 est aussi responsable de l'IPV et provoque vulvovaginite et balanoposthite.

1.3 . Le virus parainfluenza 3

Ce virus est à la fois un agent pathogène chez l'homme et les animaux. Chez ces derniers il est historiquement associé aux BPIE des jeunes bovins. Contrairement au pouvoir pathogène intrinsèque du VRSB et du BHV1, celui du virus parainfluenza 3 semble peu élevé.

1.3.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Le virus parainfluenza 3 appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, genre *Paramyxovirus*. Il est enveloppé et les glycoprotéines jouent des rôles majeurs dans le cycle viral infectieux. Chez les ruminants, seul le type 3 présente une importance clinique (100).

1.3.2 . Pouvoir pathogène

1.3.2.1 . Reproduction expérimentale

L'inoculation du Paramyxovirus influenza de type 3 à des veaux qui n'ont pas reçu de colostrum provoque hyperthermie, jetage et toux grasse ; la maladie guérit spontanément et rapidement. (84).

Ce virus provoque une nécrose des cellules épithéliales, trachéales, bronchiques et alvéolaires. Parallèlement, on note un afflux de cellules mononucléées accompagné de quelques syncytia à l'origine d'une infiltration périfonchique et interstitielle (46).

Cependant, on constate que les troubles cliniques sont généralement discrets lors de ces inoculations expérimentales.

1.3.2.2 . Pathologie spontanée

Le virus PI3 se multiplie d'abord dans la muqueuse respiratoire, puis une virémie transitoire peut se produire. Cependant, c'est principalement un virus respiratoire et il se dissémine localement. Il infecte les cellules épithéliales du tractus respiratoire antérieur et postérieur ainsi que les macrophages alvéolaires. La multiplication virale provoque de l'hyperplasie et de la nécrose de la muqueuse avec une destruction des cellules ciliées (101).

La forme aiguë est rare et limitée aux jeunes animaux. En effet, Stott et al. (99) ont démontré que si les infections spontanées à PI3 sont très fréquentes, elles n'entraînent que des signes cliniques discrets, voire absents. PI3 n'a donc pas un pouvoir pathogène très élevé et semble n'avoir d'importance qu'en tant qu'agent initiateur (84). Il est fréquemment isolé et identifié avec d'autres virus lors de troubles respiratoires (35) et la gravité des pneumonies qu'il induit tient surtout aux surinfections bactériennes qui masquent les lésions primitives (8).

1.3.3 . Aspects épidémiologiques

Le virus est distribué dans le monde entier. Le taux d'infection élevé est confirmé par la forte prévalence du PI3 dans le cheptel français, soit 65 à 70% (35) où toutes les classes d'âge peuvent être touchées par ce virus.

L'infection se produit par voie respiratoire. Les veaux sont infectés en partageant le même volume d'air que des animaux infectés excréteurs. Cette situation est particulièrement rencontrée dans les véhicules au cours du transport des animaux et lors de l'allotement d'animaux pour l'engraissement.

De grandes quantités de virus sont excrétées par le jetage. Le veau infecté excrète le virus PI3 durant 8 à 10 jours. Ce virus est très stable dans les aérosols quand la température est basse (101).

Le virus bovin est distinct des virus PI3 ovin et humain. Cependant des infections croisées peuvent exister (100).

Après ces virus à tropisme respiratoire marqué, abordons le virus de la maladie des muqueuses qui a une action plus générale sur l'organisme.

1.4 . Le virus de la maladie des muqueuses

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est un des plus importants agents infectieux des bovins mais son rôle exact en pneumologie n'est pas clairement établi même si la mise en évidence de ce virus lors de troubles respiratoires est fréquente.

1.4.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Le virus BVD appartient au genre Pestivirus dans la famille des *Flaviviridae*. Dans ce genre, on retrouve le virus de la Peste Porcine Classique et le virus de la Border Disease (38). Le BVDV est un petit virus enveloppé dont le matériel génétique se compose d'un ARN monocaténaire de polarité positive (38). Comme la plupart des virus à ARN, il fait preuve d'une grande variabilité génomique (74). L'ARN est traduit dans les cellules-hôtes en une polyprotéine unique qui, après maturation, conduira à 4 protéines de structure et 6 ou 7 protéines non-structurales (38). Le BVDV peut se présenter in vitro sous deux biotypes appelés cytopathogène (cp) et non-cytopathogène (ncp), selon l'induction ou non d'un effet lytique sur les cultures cellulaires. Il semblerait que la souche cp dérive par mutation de la souche ncp hébergée par les animaux porteurs asymptomatiques (72). Seules des souches ncp sont isolées des poumons.

1.4.2 . Pouvoir pathogène

1.4.2.1 . Reproduction expérimentale

Les expérimentations essayant de reproduire une affection respiratoire avec le seul BVDV n'ont abouti qu'à créer des lésions discrètes (38). En revanche, un effet de synergie est observé lors d'infection successive par le BVDV et par *Pasteurella haemolytica* biosérotype A1. Cet effet potentialisateur du BVDV s'exerce vis-à-vis d'autres agents, comme le BHV1, le PI3. Il semble donc que le BVDV soit peu pneumopathogène par lui-même (91).

1.4.2.2 . Pathologie spontanée

Ce pestivirus possède un tropisme tissulaire très varié (épithélium de type malpighien digestif et cutané, épithélium intestinal, cellules lymphoïdes, endothéliales, neuronales) à l'origine du polymorphisme clinique. L'action du virus sur les cellules lymphoïdes conduit à une immuno-dépression. On constate une altération fonctionnelle des granulocytes neutrophiles (diminution des propriétés germicides, de la cytotoxicité dépendante des anticorps) et des lymphocytes B et T (diminution de la réponse aux mitogènes) (91). Aussi, le

rôle le plus important du BVDV dans le complexe BPIE repose sur la dépression des fonctions immunes pulmonaires, permettant ainsi les surinfections bactériennes (38) qui peuvent se traduire par des pleurésies et des broncho-pneumonies fibrino-purulentes (75).

1.4.3 . Epidémiologie

1.4.3.1 . Période d'incubation

L'infection aiguë qui suit la primo-infection d'un animal sensible après la naissance se traduit normalement par une période d'incubation de 5 à 7 jours suivie d'une hyperthermie transitoire (100).

1.4.3.2 . Sources et réservoirs de virus

Le BVDV est très répandu. Il est présent sur tous les continents. La prévalence des bovins séropositifs varie de 36 à 88 p. cent selon les localisations géographiques (28). En France, 60 à 80% des bovins testés possèdent des anticorps dirigés contre le BVDV (84).

L'IPI, infecté persistant immunotolérant, constitue le réservoir de virus majeur pour le troupeau (28). Les animaux infectés de manière persistante par le BVDV hébergent uniquement le biotype ncp, alors que les deux biotypes peuvent être isolés chez les animaux atteints de maladie des muqueuses (72).

1.4.3.3 . Mode de contamination

On observe deux types de transmission du virus : horizontale et verticale.

Lors d'une transmission horizontale, la contamination se fait essentiellement par contact direct (72). Le virus BVDV pénètre alors chez un animal naïf via l'appareil respiratoire, l'appareil digestif ou la conjonctive (100).

D'autre part, lorsqu'une vache gestante est infectée, le virus peut traverser la barrière placentaire et contaminer le fœtus. Le résultat de cette infection dépend du stade de développement atteint par le fœtus au moment de la contamination. Seules les souches ncp traversent la barrière placentaire. Si l'infection se produit avant le 125^e jour de gestation, il

peut en résulter la naissance de veaux infectés de manière persistante et immunotolérants (IPI) envers la souche infectante.

Ces veaux, apparemment sains dans la majorité des cas, excrètent continuellement le virus et contaminent le reste du troupeau de façon silencieuse. Ils jouent ainsi un rôle clé dans l'épidémiologie du BVDV. Notons également qu'une vache IPI donne naissance à des veaux IPI et qu'un taureau IPI peut transmettre le virus par son sperme (72).

1.4.3.4 . Facteurs sensibilisants

Le regroupement d'animaux provenant de multiples origines offre une probabilité élevée d'introduire un bovin excréteur permanent de BVDV et favorise la propagation du virus. Cela conduit à l'infection des individus non encore immunisés, dans le premier mois après l'allotement. Ainsi, chez les taurillons à l'engrais il s'agit d'un des virus le plus souvent identifiés (91).

Les nouveau-nés sont également une cible privilégiée du BVDV dans son expression respiratoire (111).

1.4.4 . *Tableau clinique*

Le virus BVD est à l'origine, chez les bovins, de tableaux cliniques très divers dans lesquels on retrouve : diarrhée, fièvre, anorexie, leucopénie, chute de la production laitière ; syndrome hémorragique ; nombreux troubles de la reproduction et maladie des muqueuses proprement dite, souvent fatale (72). Un bovin atteint de maladie des muqueuses est initialement immunotolérant vis-à-vis d'une souche ncp de BVDV, et est infecté ultérieurement par une souche cp présentant une homologie marquée avec la souche ayant induit l'infection persistante (92).

Dans la pathologie qui nous intéresse, nous avons vu que le BVDV a un rôle indirect dans les troubles respiratoires. Ceci explique probablement l'absence de tableau clinique ou lésionnel spécifique. Les lésions pulmonaires observées, par exemple, lors de pleuropneumonie fibrineuse, s'expliquent par l'action pathogène des agents de surinfection, en l'occurrence *Mannheimia haemolytica*.

L'implication du BVDV dans les affections respiratoires est de toute évidence complexe. Mais il existe assez de preuves pour le considérer comme membre à part entière du complexe des affections respiratoires bovines.

A l'image du virus de la maladie des muqueuses, le coronavirus joue un rôle important, en période néonatale, en pathologie digestive en entraînant des diarrhées. Mais certaines souches seraient susceptibles d'avoir également un tropisme respiratoire et d'être à l'origine de pneumoentérites.

1.5 . Le coronavirus

Peu d'auteurs ont étudié le rôle de cet agent en pathologie respiratoire.

1.5.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Le coronavirus appartient à la famille des *Coronaviridae*. C'est un virus à ARN d'une grande fragilité (112). Il est également bien connu en tant qu'agent pathogène à tropismes respiratoire et digestif chez le porc et la poule.

1.5.2 . Pouvoir pathogène

1.5.2.1 . Reproduction expérimentale

Des troubles respiratoires ont été reproduits en inoculant par voie intranasale du Coronavirus à des veaux gnotobiotiques. Les troubles cliniques observés sont plus ou moins graves selon les animaux (85).

1.5.2.2 . Pathologie spontanée

Très peu de communications rapportent l'existence du coronavirus dans le rôle d'agent pathogène associé aux troubles respiratoires des bovins. Wellmans et al (112) décrivent des troubles respiratoires sur des bovins de 250 kg sur lesquels ils ont réussi à isoler un coronavirus à partir des poumons. Bosgiraud et al (10) ont signalé deux cas en France où des

coronavirus ont été isolés lors de troubles respiratoires. Cliniquement, les troubles sont peu marqués. Par contre, des manifestations entéritiques peuvent être reliées au coronavirus (52).

1.5.3 . Aspects épidémiologiques

Hormis le fait que la prévalence du coronavirus semble élevée dans les élevages de bovins (112), il n'existe pas d'information épidémiologique dans cette espèce en matière de pathologie respiratoire.

1.6 . Les Adenovirus

Les adénovirus, comme les coronavirus, peuvent être à l'origine de manifestations cliniques de pneumoentérites. Ils sont étudiés depuis 1960 où les premiers isolements eurent lieu mais leur implication en pathologie respiratoire a été peu étudiée.

1.6.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Ces virus à ADN sont des *Mastadenovirus* qui appartiennent à la famille des *Adenoviridae*. Il est décrit 9 types d'Adénovirus chez les bovins. Le plus pathogène dans cette espèce est l'Adénovirus 3 (62). Ce sont des virus non enveloppés se présentant sous la forme d'une nucléocapside possédant une fibre appelée hexon à chaque sommet (100).

1.6.2 . Pouvoir pathogène

1.6.2.1 . Reproduction expérimentale

L'inoculation expérimentale au jeune veau entraîne, surtout sous l'effet d'un stress simultané, des lésions étendues caractérisées par une occlusion des bronchioles avec nécrose aboutissant au collapsus des alvéoles (105).

1.6.2.2 . Pathologie spontanée

Dans les cas de pathologie spontanée, où l'on a identifié l'Adénovirus 3, les animaux présentaient des troubles respiratoires légers et une réaction fébrile accompagnés d'une diminution du gain de croissance quotidien (63). Ce virus provoquerait une bronchiolite

nécrosante (46) et des troubles entéritiques plus ou moins sévères (62). Enfin, des animaux peuvent faire une séroconversion sans pour autant présenter de troubles cliniques (17). L'Adénovirus 3 ne semble donc jouer qu'un rôle mineur en pathologie respiratoire.

1.6.3 . Aspects épidémiologiques

La période d'incubation varie de 7 à 10 jours chez les veaux de 3 semaines à 4 mois (101).

Les Adénovirus sont présents dans le monde entier (100). La prévalence de l'Adénovirus 3 est de 75 à 85% dans le cheptel français (35). Toutes les classes d'âge peuvent être touchées par ce virus (63) .

L'animal infecté excrète le virus par les sécrétions nasales et conjonctivales, les matières fécales et l'urine (101).

Les adénovirus bovins sont très stables dans le milieu extérieur (100).

En conclusion, il faut signaler la présence possible de rhinovirus, de réovirus et d'entérovirus dont le pouvoir pathogène n'est pas reconnu ou bien est franchement contestable chez les bovins (35 ; 46). Enfin, certaines bactéries sont susceptibles d'être impliquées en pathologie respiratoire tout comme les virus que nous venons d'étudier.

2 . LES PRINCIPAUX AGENTS BACTERIENS ASSOCIES AUX TROUBLES RESPIRATOIRES DES BOVINS

Les agents microbiens impliqués dans les maladies respiratoires des bovins sont de nature virale mais aussi bactérienne. Les bactéries les plus fréquemment isolées des poumons de bovins malades sont des pasteurelles. D'autres sont également isolées comme des mycoplasmes, des salmonelles, *Histophilus somni* et des bactéries à Gram positif.

Nous n'envisagerons pas ici la tuberculose bovine, maladie contagieuse, causée par *Mycobacterium bovis*. C'est une maladie chronique qui présente très rarement des symptômes

avant un stade avancée. De plus, son dépistage prophylactique obligatoire retire l'intérêt diagnostique de l'aspiration transtrachéale à son encontre.

2.1 . Le genre *Pasteurella*

Les pasteurelles, par leur fréquence d'isolement et l'importance de leur pouvoir pathogène, sont les bactéries qui méritent le plus d'attention.

2.1.1 . *Mannheimia haemolytica*

2.1.1.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Les pasteurelles appartiennent à la famille des *Pasteurellaceae*. Ce sont de petits bacilles, parfois polymorphes, immobiles, asporulés à Gram négatif, oxydase positive (58).

Au sein de l'ex-espèce bactérienne *Pasteurella haemolytica*, on reconnaissait trois biotypes : A, T et un troisième regroupant les autres souches. Il a été montré que les souches A et T sont distinctes. Depuis 1990, les souches de biotype T se nomment *Pasteurella trehalosi* et, depuis 1999, les souches de biotype A se nomment *Mannheimia haemolytica*.

Le biotype A est le biotype le plus important en pathologie respiratoire des bovins ; la plupart des 17 sérotypes de l'ex-espèce *Pasteurella haemolytica* appartiennent à ce biotype. Le biosérotipe A1 de *Mannheimia haemolytica* est le plus souvent isolé lors d'atteinte respiratoire profonde et le biosérotipe A2 est le plus fréquemment isolé du nasopharynx des animaux sains. Mais, depuis quelques années, le biosérotipe A6 est de plus en plus souvent isolé des poumons pathologiques de bovins (27). Les biosérotypes A1 et A6 sont extrêmement similaires, à part la nature de leur capsule. Leurs protéines de membrane externe sont très proches (2).

2.1.1.2 . Pouvoir pathogène

Mannheimia haemolytica est la pasteurelle réputée la plus pathogène chez les bovins. Mais, le plus souvent, la « pasteurellose » est secondaire soit à une primo-infection virale ou

mycoplasmique, soit à un autre facteur d'agression (stress, mauvaise ambiance dans le bâtiment...).

2.1.1.2.1 . Reproduction expérimentale

D'une manière générale, l'administration de *Mannheimia haemolytica* par voie nasale chez des animaux sains est peu probante. Les bactéries qui pénètrent jusqu'au poumon sont rapidement éliminées (90% en quatre heures), avec tout au plus l'apparition d'une fièvre transitoire et d'une infiltration neutrophilique discrète du poumon. Mais le « shunt » des premières voies respiratoires permet une reproduction plus aisée des lésions pulmonaires de pasteurellose. Au final, *Mannheimia haemolytica* apparaît néanmoins comme un agent pathogène majeur (27).

2.1.1.2.2 . Pathologie spontanée

L'expression du pouvoir pathogène de *Mannheimia haemolytica* 1 est conditionnée par une première multiplication locale, dans le nasopharynx, des germes, concomitante d'une altération des mécanismes de défense de l'appareil respiratoire. *Mannheimia haemolytica* 1 adhère alors à l'épithélium grâce à ses facteurs d'attachement (pili, capsule), et ce d'autant plus facilement qu'un agent pathogène primaire a lésé préalablement la muqueuse (27).

L'ensemencement secondaire de l'appareil respiratoire profond conduit à la maladie. Il aurait lieu principalement par inhalation des exsudats virulents stagnant dans les régions postérieures des cavités nasales où la concentration en bactéries s'élève très fortement au début de la maladie, mais aussi par inhalation du véritable aérosol bactérien formé lors du passage de l'air dans le naso-pharynx d'un animal en polypnée (31).

L'inflammation qui résulte de la multiplication du germe dans le poumon s'accompagne d'un afflux massif de polynucléaires neutrophiles (27). Mais la bactérie semble capable de résister à la phagocytose et à l'activité bactéricide de ces neutrophiles et macrophages alvéolaires, soit grâce à la capsule, soit grâce à la destruction de ces cellules par la leucotoxine sécrétée en phase de pleine multiplication (2). Elle assure ainsi sa propre colonisation par cette activité immunosuppressive d'altération des différentes cellules du système immunitaire (31). La libération des enzymes intracellulaires exacerbe la réponse inflammatoire. De cette

réaction inflammatoire non contrôlée résultent les lésions typiques de pneumonie broncho-alvéolaire fibrineuse ou fibrinohémorragique avec présence de foyers de nécrose (27).

Le tiers antéroventral du poumon est préférentiellement atteint, avec des lésions symétriques, largement exsudatives et fibrineuses. Elles sont souvent accompagnées de lésions de pleurésie fibrineuse entraînant des adhérences entre lobes ou entre lobe et plèvre. Les ganglions médiastinaux sont hypertrophiés et succulents. Histologiquement, la nécrose de coagulation est la lésion la plus caractéristique de la pasteurellose à *Mannheimia haemolytica* (27). Les bronches contiennent alors de la fibrine, du mucus, des caillots sanguins, du pus et des produits de nécrose (57).

On retrouve les mêmes mécanismes pathogéniques avec le sérotype 6 qui possède un pouvoir pathogène équivalent au sérotype 1.

2.1.1.3 . Epidémiologie

2.1.1.3.1 . Période d'incubation

Dans une unité d'élevage, l'incubation de la maladie peut varier de 2 à 15 jours suite à un stress (57). Mais, dans une nouvelle forme de BPIE, caractérisée par une pneumonie et une pleurésie aiguës, due à *M.haemolytica*, la durée d'incubation d'un foyer est limitée à environ 2-3 semaines (2).

2.1.1.3.2 . Sources et réservoirs de germes

Les pasteurelles sont des hôtes normaux du nasopharynx des bovins, où elles vivent en germes commensaux, sous forme de flore dominée (27). On retrouve également toutes les souches de *Mannheimia haemolytica* chez les ovins.

La bactérie n'est pas retrouvée dans le milieu extérieur, sauf lorsque celui-ci est contaminé par un animal excréteur. Sa résistance dans le milieu extérieur est faible (à 20 °C, 24 heures dans la paille et 3 jours dans l'eau). Elle est augmentée par le froid ou l'humidité (à 4°C, 48 heures dans la paille et 7 jours dans l'eau) (27).

2.1.1.3.3 . Mode de contamination

Le veau se contamine très tôt après sa naissance, sans doute par contact nez à nez avec sa mère (27).

2.1.1.3.4 . Facteurs sensibilisants

La rupture d'équilibre entre les bactéries commensales et l'hôte trouve son origine dans les stress de transport, les regroupements d'animaux, les mauvaises conditions climatiques ou les brusques changements d'alimentation. Les infections respiratoires virales ou mycoplasmaïques constituent d'autres facteurs favorisants importants (27).

2.1.1.4 . Tableau clinique

La maladie se caractérise par une dépression de l'état général avec une forte fièvre. La température rectale atteint au moins 40°C, le rythme cardiaque est augmenté et les animaux refusent de s'alimenter.

L'atteinte de l'appareil respiratoire se manifeste par une polypnée, un jetage nasal d'abord séreux puis rapidement mucopurulent, pour finir par se dessécher et former des croûtes sur le mufler. La rhinite s'accompagne de larmoiement. Les mouvements respiratoires, accrus dans les premiers stades de la maladie, sont suivis par de la dyspnée. La toux est souvent relevée et varie dans ses caractéristiques : elle peut être grasse ou douloureuse et retenue. Les animaux peuvent tenir leurs coudes en abduction et l'encolure en extension.

L'auscultation révèle une augmentation des bruits vésiculaires et bronchiques dans les régions antérieures et déclives des poumons. Progressivement, on entend des râles humides puis secs. Des bruits de friction pleurétique peuvent être décelés dans les mêmes zones. La diarrhée survient chez certains animaux et il y a toujours une perte considérable de poids.

L'évolution de la maladie est habituellement courte mais peut atteindre deux à trois semaines à l'échelle du troupeau (57).

2.1.2 . *Pasteurella multocida*

Les études concernant *Pasteurella multocida* sont moins avancées que celles effectuées sur *Mannheimia haemolytica*. Pourtant, un bilan national a montré en 2002, qu'au cours des années précédentes, les fréquences relatives des souches de *P. multocida* et de *M. haemolytica* se sont inversées, *P. multocida* occupant aujourd'hui la première place devant *M. haemolytica* en régression dans les prélèvements pathologiques (27).

2.1.2.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

On isole régulièrement de poumons de bovins, *Pasteurella multocida*, au type capsulaire A, au type somatique 3 (*P. multocida* A₃). Les souches isolés chez les bovins sont dépourvues de pili et ne produisent pas de toxine (27).

2.1.2.2 . Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de ces pasteurelles apparaît moins important que celui de *M. haemolytica*.

2.1.2.2.1 . Reproduction expérimentale

Il semble que la reproduction de bronchopneumonie chez le veau inoculé avec *P. multocida* nécessite une infection virale ou mycoplasmique préalable (59).

2.1.2.2.2 . Pathologie spontanée

Le portage de *Pasteurella multocida* est fréquent en zone nasopharyngée et trachéale (32). Cette bactérie présente un profil d'agent à faible pouvoir pathogène, voire opportuniste (3).

2.1.2.3 . Aspects épidémiologiques

P. multocida rejoint *M. haemolytica* au palmarès des bactéries les plus souvent isolées en Europe. Mais le pourcentage de prélèvements contenant *P. multocida* apparaît plus important chez les très jeunes animaux que chez les animaux plus âgés (2).

2.2 . Les mycoplasmes

Les mycoplasmes sont souvent les bactéries les plus fréquemment isolées des poumons pathologiques de bovins mais les différentes espèces ne possèdent pas toutes le même pouvoir pathogène naturel. Un pouvoir pathogène quelconque n'a même jamais pu être démontré chez *M. bovirhinis*, *M. arginini*, *M. bovigenitalium* et *Acholeplasma laidlawii*.

2.2.1 . *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma bovis a été isolé pour la première fois en 1961 à partir d'un lait de mammite. Depuis, il s'avère être le seul mycoplasme réellement et fréquemment impliqué dans les problèmes respiratoires des jeunes bovins. Jusqu'à présent, son rôle dans la pathologie respiratoire a été mal évalué.

2.2.1.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Mycoplasma bovis appartient à la classe des Molliculites, à l'ordre des Mycoplasmatales, à la famille des *Mycoplasmataceae*. Les Molliculites se présentent sous la forme de petites sphères de 0,2 à 0,3 micromètres de diamètre et se distinguent des autres bactéries par leur absence de paroi. Ils sont donc naturellement résistants aux antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi, comme les bêta-lactamines. Le contenu cytoplasmique du mycoplasme est entouré d'une simple membrane plasmique qui joue un rôle de médiateur privilégié dans les échanges avec le milieu extérieur et dans les interactions avec l'hôte. Les études des dernières années, dont le but était de mieux comprendre la surface de ce mycoplasme, ont révélé la présence d'un système génétique complexe codant pour une famille de lipoprotéines de surface saillantes, les Vsps, qui sont abondamment exprimées à la surface du pathogène (20).

2.2.1.2 . Pouvoir pathogène

2.2.1.2.1 . Reproduction expérimentale

La reproduction expérimentale d'affections mycoplasmiques est toujours difficile. Cependant pour *M. bovis*, cette démonstration est sans ambiguïté. L'inoculation de *M. bovis* chez des veaux gnotobiotiques (à flore microbienne contrôlée et élevés en isolateur) permet de

reproduire une pneumonie cliniquement exprimée, accompagnée de lésions étendues du parenchyme (48). On a, par ailleurs, démontré l'effet synergique d'une infection simultanée par *M. bovis* et *P. haemolytica*. *M. bovis* serait l'initiateur du processus infectieux (77). En effet, les troubles cliniques et les lésions de bronchopneumonie sont d'autant plus sévères que *M. bovis* a bien été inoculé avant *P. haemolytica* AI, le schéma inverse étant moins performant (32).

2.2.1.2.2 . Pathologie spontanée

Mycoplasma bovis présente un tropisme tissulaire varié entraînant des manifestations cliniques protéiformes (mammites chez l'adulte, arthrites et pneumopathies chez les veaux et les jeunes bovins...) (49).

Les mécanismes du pouvoir pathogène de *Mycoplasma bovis* sont encore mal connus du fait de l'absence de modèle animal facile à manipuler et de la difficulté à reproduire les symptômes par inoculation chez l'hôte naturel.

Les Vsps, précédemment citées, seraient impliquées dans la phase de colonisation grâce à leur propriété d'adhésion aux cellules hôtes (20). Ainsi, *M. bovis* adhère aux épithéliums et altère les mécanismes de transport mucociliaire (27). Les Vsps ont une grande variabilité d'expression, qui entraîne une incroyable diversité phénotypique de surface au sein d'une population clonale, faisant de *M. bovis* une sorte de caméléon. Elles participeraient ainsi à l'échappement à la réponse humorale de l'hôte (20).

Un certain pouvoir immunodépresseur s'ajoute à ces facteurs de pathogénicité, favorisant la genèse de lésions de pneumonie interstitielle.

A cette action pathogène au niveau de l'appareil respiratoire s'ajoute un réel pouvoir invasif et septicémique qui explique la fréquence des atteintes articulaires, à la suite de problèmes respiratoires.

Mais, dans l'état actuel des connaissances, son activité pathogène directe n'est pas démontrée contrairement à son rôle d'initiateur et de potentialisateur, largement admis. Il est ainsi souvent isolé en association avec d'autres agents pathogènes, des Pasteurelles en particulier (27).

Enfin, le tableau clinique suggère que les lésions causées par *M. bovis* sont dues à des réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte plutôt qu'à des effets toxiques (20)

2.2.1.3 . Aspects épidémiologiques

2.2.1.3.1 . Période d'incubation

L'incubation dure de deux à six jours (50).

2.2.1.3.2 . Sources et réservoirs de germes

Mycoplasma bovis est présent dans le monde entier et l'infection due à ce pathogène semble en extension dans la population bovine en Europe (49).

En France, les affections à *M. bovis* sont fréquentes. Différentes enquêtes sérologiques révèlent un taux d'infection des animaux et des troupeaux respectivement voisins de 10 p.cent et 40 p.cent (48). Dans les foyers, *M. bovis* diffuse largement et rapidement, 50 % des animaux présentant une montée d'anticorps significative (contre 35% pour les principaux virus) (81).

Les premières sources d'infection sont les animaux malades. On retrouve le germe dans le lait lors de mammite mycoplasmaïque mais aussi dans l'urine, les muqueuses pituitaire et conjonctivale. Lors de pneumonie, 10^6 à 10^8 germes sont isolés par gramme de poumon (49).

Mais les animaux convalescents peuvent rester excréteurs pendant des mois. Lors de mammite, l'excrétion peut se poursuivre lors de la lactation suivante. De fait, dans les foyers, la proportion d'animaux infectés latents est élevée et constitue un risque de contamination insidieux.

D'autre part, les mycoplasmes, dépourvus de paroi, sont des bactéries très fragiles. Leur survie en dehors d'un organisme est limitée dans le temps. Cependant, ils survivent assez longtemps sur tous les matériaux d'une salle de traite : 60 jours à 4°C dans le lait, 18 jours à 20°C dans les éponges, 13 jours à 20°C dans la paille, 18 jours à 20°C dans l'eau et 230 jours dans le fumier. *M. bovis* résiste également plusieurs années dans le sperme congelé (49).

2.2.1.3.3 . Mode de contamination

La principale voie d'entrée de *M. bovis* est la muqueuse respiratoire et occasionnellement la voie orale chez le jeune veau lors de la tétée. Chez les vaches, la contamination des glandes mammaires se fait par voie hématogène à partir d'infections pulmonaires ou articulaires (20). L'infection génitale peut se faire à partir de sperme

contaminé. Une transmission à la descendance par voie transplacentaire au moment de la parturition a également été observée (49).

2.2.1.4 . Tableau clinique

Mycoplasma bovis entraîne des affections diverses. Les pneumonies, qui nous intéressent ici, mais aussi les arthrites et les mammites sont les plus fréquentes. Ce mycoplasme est également associé à des otites moyennes, des avortements, des endométrites, des salpingites et des ovarites (20).

L'affection respiratoire ne présente aucune spécificité symptomatologique mais une hyperthermie, un abattement, une baisse d'appétit et un jetage sont observés (50). Les troubles respiratoires associent une accélération de la fréquence respiratoire à une respiration costo-abdominale avec des râles audibles à l'auscultation (83). *M. bovis* est plus fréquemment isolé dans les bronchopneumonies catarrhales mais on le trouve aussi lors de bronchopneumonies chroniques associées, dans la moitié des cas, à des abcès (48).

Histologiquement, on observe une infiltration de cellules mononucléées en région pérbronchiolaire et alvéolaire, des foyers de nécrose coagulative entourés de cellules mononucléées et des foyers de bronchiolite suppurative associées à une hyperplasie lymphoréticulaire (48).

2.2.2 . *Mycoplasma mycoides spp mycoides*

M. mycoides mycoides SC est l'espèce mycoplasmaïque la plus pathogène chez les bovins. Il est l'agent de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB), maladie réputée légalement contagieuse. C'est une affection sporadique en Europe. La France est indemne depuis 1985. Nous n'irons donc pas plus loin dans la description de ce germe.

D'autres mycoplasmes sont à prendre en considération même si leur pouvoir pathogène n'a rien de commun avec celui des deux espèces précédentes.

2.2.3 . *Mycoplasmes à pouvoir pathogène occasionnel*

Mycoplasma dispar et *Ureaplasma diversum* sont aussi fréquemment isolés des lésions. Expérimentalement, ils génèrent au plus une infection subclinique et doivent être considérés comme des agents pathogènes occasionnels, qui participent à l'initiation des troubles respiratoires (27).

2.2.3.1 . *Mycoplasma dispar*

Mycoplasma dispar est un hôte fréquent du tractus respiratoire chez l'animal sain. L'infection du jeune est précoce ; cantonnée d'abord aux cavités nasales, elle s'étend fréquemment à l'appareil respiratoire profond au-delà du 4^{ème} mois. En pratique, son isolement, même à partir du poumon profond, n'a que peu de signification étiologique. C'est pour cette raison qu'il ne fait pas l'objet de recherche systématique en France (77). Chez les animaux de plus de 10 mois, l'infection se limite rapidement à un simple portage nasal (76).

Chez des veaux gnotobiotiques, *M.dispar* provoque une infection qui reste superficielle, limitée aux cellules épithéliales ciliées, provoquant l'arrêt des mouvements ciliaires (59). Lors d'atteinte du poumon, une bronchiolite subclinique modérée avec formation de manchons lymphoïdes apparaît (42).

2.2.3.2 . *Ureaplasma diversum*

Il est probable qu'un schéma équivalent à *M. dispar* puisse être appliqué à ce germe. Expérimentalement, il serait pathogène mais il apparaît comme un composant banal des flores bactériennes bovines, notamment génitale et oculaire (77). Il provoque également une bronchiolite subclinique après inoculation à des veaux gnotobiotiques (42).

D'autres bactéries sont isolées moins fréquemment mais possèdent néanmoins un certain pouvoir pathogène. C'est le cas des salmonelles.

2.3 . Les salmonelles

Les formes respiratoires des salmonelloses, parmi leurs tableaux cliniques très variés, sont relativement fréquentes en pathologie bovine.

2.3.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Les salmonelles sont des entérobactéries, à Gram négatif, mobiles, asporulées dont les sérovars les plus fréquemment isolés en pathologie du veau sont *Salmonella typhimurium* et *Salmonella dublin* (55). Ces bactéries possèdent un pantropisme tissulaire à l'origine d'un polymorphisme clinique.

2.3.2 . Pouvoir pathogène

L'infection salmonellique constitue un remarquable modèle d'entéro-invasion. La première étape de l'infection concerne l'implantation des salmonelles dans l'intestin. Si la multiplication locale est abondante, elle entraîne une entérocolite, qui se traduit par des symptômes diarrhéiques. Toutefois cette phase peut rester silencieuse. Avec les souches invasives et chez les sujets sensibles, la translocation vers les nœuds lymphatiques mésentériques est suivie d'une phase de dissémination systémique. Elle se manifeste par un syndrome fébrile avec abattement et choc dus à l'activité de l'endotoxine bactérienne (56).

De par sa grande réceptivité aux infections bactériennes, l'appareil respiratoire des bovins est prédisposé aux localisations secondaires des salmonelles dans les poumons (56). On observe, à l'autopsie, des lésions exsudatives fibrineuses ou nécrotiques (14).

2.3.3 . Aspects épidémiologiques

Les atteintes respiratoires sont souvent décrites chez les jeunes veaux, particulièrement sensibles aux infections salmonelliques (56). On rencontre fréquemment ce type d'affection dans les grandes unités d'élevage intensif où elles peuvent simuler une infection virale enzootique (55). Les jeunes veaux, séparés très tôt de leur mère, sont fréquemment immunodéficients à leur arrivée dans les ateliers. De plus, le stress du transport et de la mise en lot accroît leur réceptivité à l'infection. Les souches dotées d'un fort pouvoir invasif

franchissent alors très rapidement la barrière épithéliale de l'intestin pour une dissémination systémique et une colonisation pulmonaire précoces (56).

Salmonella typhimurium frappe généralement entre 1 et 4 semaines alors que *Salmonella Dublin*, qui domine la pathologie des bovins adultes, s'attaque à des animaux plus jeunes (4 à 11 semaines) (55).

Classiquement l'animal se contamine par voie orale. Mais dans des conditions de fort confinement, la survie des salmonelles dans les aérosols, permise par l'hygrométrie élevée, autorise des contaminations par voie aérienne et conjonctivale, expliquant les flambées d'allure grippale (56).

2.3.4 . *Tableau clinique*

Chez les veaux, la salmonellose respiratoire est souvent une complication de forme typique. Au syndrome fébrile s'ajoutent des signes locaux d'entérocologie. La déshydratation s'installe et l'animal s'affaiblit très rapidement. Il entre dans un état d'abattement profond qui peut se terminer par la mort. Dans certains cas, l'évolution est plus lente et permet l'établissement de foyers infectieux secondaires, notamment pulmonaires, après une phase de rémission des premiers symptômes (56).

Mais les signes digestifs peuvent rester discrets voire absents et les signes respiratoires constituer les seules manifestations de l'infection salmonellique qui prend alors une allure de maladie respiratoire pure. L'atteinte de l'appareil respiratoire se traduit alors par de la dyspnée, de la polypnée, une toux sèche, quinteuse, un jetage séreux puis muqueux. Cette forme ne présente pas de particularités cliniques permettant de la distinguer des autres bronchopneumonies infectieuses enzootiques (56). Toutefois, il faut souligner le caractère très contagieux de la maladie chez les jeunes veaux au cours du mois qui suit leur allotement. En l'absence de traitement la maladie évolue rapidement vers la mort chez les plus jeunes animaux (55).

On décrit aussi des formes respiratoires de salmonellose chez les bovins adultes. Les signes généraux dominent alors le tableau clinique par leur gravité. L'atteinte respiratoire est

souvent une trouvaille d'autopsie révélant une broncho-pneumonie ou une pneumonie des lobes craniaux et moyens, voire caudaux, associée ou non à une pleurésie de gravité variable. En effet, ces septicémies salmonelliques aboutissent rapidement à la mort en l'absence de traitement adapté (56).

2.4 . *Histophilus somni*

Histophilus somni a été identifié pour la première fois chez les bovins en 1956. A cette époque, sa seule manifestation clinique semblait être la méningo-encéphalite thromboembolique (METE). Mais *Histophilus somni* provoque également des troubles de reproduction, des myocardites, des otites, des conjonctivites, des mammites, des polyarthrites et des maladies respiratoires.

2.4.1 . Taxonomie – Principales caractéristiques

Histophilus somni est une bactérie Gram négatif rattachée à la famille des *Pasteurellaceae*. C'est un petit bacille, immobile, asporulé, oxydase positive (58).

2.4.2 . Pouvoir pathogène

2.4.2.1 . Reproduction expérimentale

Des études d'inoculation d'*Histophilus somni* par voie endobronchique sur des veaux sevrés démontrent que les troubles respiratoires sont plus sévères lorsque les veaux ont été préalablement exposés au virus respiratoire syncytial bovin ou au virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (41). *Histophilus somni* peut provoquer une pneumonie mais également une pleurésie fibrineuse grave, une myocardite, une septicémie, une péricardite (39).

2.4.2.2 . Pathologie spontanée

Le schéma pathogénique est le même que celui des pasteurelles. Dans un premier temps, les bovins peuvent être porteurs au niveau du rhinopharynx de virus respiratoires et de bactéries potentiellement pathogènes. Un stress peut initier une bronchopneumonie résultant de l'action synergique et séquentielle des virus puis des bactéries (pasteurelles et *H. somni*)

qui colonisent l'appareil respiratoire profond. Ce n'est que dans un très faible pourcentage de cas que des complications de septicémie peuvent survenir entraînant des thromboses (59).

Histophilus somni endommage alors les cellules endothéliales des petits vaisseaux sanguins, découvrant ainsi les couches sous-jacentes. Cela active le mécanisme de coagulation et induit la formation d'un thrombus. On considère aujourd'hui que la lésion est un thrombus in situ et non un embol. L'interruption de la circulation sanguine entraîne la destruction des tissus concernés et le développement des signes cliniques (41).

2.4.3 . Aspects épidémiologiques

Histophilus somni colonise le tractus reproducteur chez le mâle comme chez la femelle. Ce dernier constitue probablement le réservoir du micro-organisme (39).

Histophilus somni est incapable, dans la plupart des cas, de survivre longtemps en dehors de l'organisme hôte. Cependant, la bactérie peut survivre jusqu'à 70 jours dans le mucus nasal et le sang à 23,5°C et jusqu'à 5 jours dans le mucus vaginal (24). On peut la retrouver également pendant une courte période dans les urines (39).

En effet, l'infection se propage par les voies respiratoires en provenance des excréments et sécrétions urogénitales (41). D'où la possibilité importante de transmission dans les allotements (39).

2.4.4 . Tableau clinique

Dans les voies respiratoires hautes, *Histophilus somni* peut être la cause de laryngite et de trachéite. C'est souvent la seule bactérie isolée des lésions mais des germes opportunistes peuvent s'y trouver secondairement comme des pasteurelles, *Arcanobacterium*... (41).

Lors d'hémophilose, on observe divers signes cliniques souvent précédés d'une déclaration de METE. On constate alors des troubles nerveux. Certains animaux apparaissent moribonds mais d'autres sont retrouvés morts sans avoir manifesté de signes cliniques préalables.

Les animaux qui souffrent d'infarctus/abcès du myocarde lié à ce germe peuvent être retrouvés morts ou manifester des signes cliniques similaires à ceux d'une maladie respiratoire ou des signes d'insuffisance cardiaque congestive. Les lésions du myocarde apparaissent de manière typique dans le ventricule gauche. La nature de la lésion varie d'une nécrose focale ovoïde à un abcès purulent. Les symptômes lors de lésions péricardiques, de pneumonie ou de pleurésie sont alors de type respiratoire. Un œdème pulmonaire apparaît souvent secondairement aux lésions cardiaques (41).

2.5 . Les bactéries Gram +

Deux espèces de bactéries peuvent être impliquées en pathologie respiratoire : *Arcanobacterium pyogenes* et *Streptococcus pneumoniae*.

2.5.1 . Arcanobacterium pyogenes

Anciennement appelé *Corynebacterium* puis *Actinomyces pyogenes*, *Arcanobacterium pyogenes* arrive en tête des isollements à partir des poumons de bovins malades parmi les bactéries à coloration de Gram positive, mais peu d'études systématiques sont disponibles sur ces bactéries (59).

A. pyogenes colonise le nasopharynx des veaux sains, comme les Pasteurellaceae, et peut proliférer rapidement à l'occasion d'un stress (59). L'afflux de granulocytes est alors massif et soutenu. Ceci conduit à une suppuration souvent multifocale. Cet exsudat, pour partie drainé par les bronches, sera circonscrit avec le temps. Il y a constitution d'abcès parenchymateux ou bronchiques (14). Ainsi, les lésions sont généralement purulentes et chroniques.

2.5.2 . Streptococcus pneumoniae

La pneumonie à *Streptococcus pneumoniae* est fréquente en Allemagne mais n'a été décelée qu'une fois en France sur un veau de 8 semaines (sérotypage 18). Ce germe est responsable d'une septicémie évoluant rapidement vers la mort du veau. Il est difficile de distinguer cliniquement cette infection d'une septicémie salmonellaire ou colibacillaire.

D'autres septicémies streptococciques avec localisations pulmonaires peuvent être observées chez le veau infecté par des streptocoques divers, souvent ubiquistes : entérocoques, *Streptococcus uberis* (59).

Cette étude étiologique des maladies respiratoires des bovins nous a présenté les différents germes en cause mais ils sont très rarement isolés seuls. Il s'agit, en effet, le plus souvent d'une « association de malfaiteurs ». En pathologie respiratoire, le déterminisme des affections est généralement multifactoriel.

3 . LES ASSOCIATIONS D'AGENTS INFECTIEUX EN PATHOLOGIE RESPIRATOIRE CHEZ LES BOVINS

Il est désormais établi que l'étiologie des maladies respiratoires est complexe avec une grande diversité de virus, bactéries, mycoplasmes pathogènes capables d'envahir et d'infecter le tractus respiratoire individuellement, séquentiellement mais aussi en association.

Dans certains foyers de BPIE, plusieurs agents pathogènes peuvent être mis en évidence à partir du même animal. Un épisode de BPIE décrit par Otter et Farrer (68) détient probablement le record avec cinq agents respiratoires pathogènes distincts provenant d'animaux différents.

Ainsi, de nombreuses associations ont été décrites en pathologie respiratoire. On peut rencontrer des associations de bactéries, de virus et des associations virus-bactéries, qu'on peut classer en trois catégories.

Certains agents à pouvoir pathogène élevé sont associés à des agents pathogènes secondaires qui participent aux troubles respiratoires en les aggravant. En effet, les virus respiratoires déclenchent souvent une maladie très contagieuse mais la gravité de la maladie résulte de l'intervention de bactéries qui compliquent l'infection virale. Les *Pasteurella* sont les plus fréquemment isolées mais en élevage intensif de veaux, les *Salmonella* peuvent être mises en cause.

Certains agents jouent un rôle d'initiateur par leur pouvoir immunodépresseur. Ainsi, les mycoplasmes ou le virus de la maladie des muqueuses ont un rôle immunodépresseur qui permet à d'autres agents de s'installer. Il existe parfois un temps de latence entre le premier et le deuxième agent. Ainsi, pour reproduire une pasteurellose sur des veaux, un délai minimum de quatre jours est nécessaire entre la première inoculation avec le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine et la seconde avec *P. haemolytica* (88). De même, nous avons vu que les bronchopneumonies induites sont plus sévères si *Mycoplasma bovis* a été inoculé avant *Pasteurella haemolytica*. Un bilan avait déjà été établi en 1979 sur 3 années d'examen bactériologiques réalisés sur 500 poumons et avait montré que plus de la moitié des *Pasteurella*, des *Arcanobacterium pyogenes* et des mycoplasmes se retrouvent en association. Une bactérie sur deux retrouvée en association l'est avec un mycoplasme ; *M. haemolytica* l'est trois fois sur quatre (59).

Enfin, certains pathogènes comme *A. pyogenes* sont des bactéries opportunistes qui se multiplient lorsque les troubles évoluent vers la chronicité.

D'autres exemples d'associations sont décrits dans la littérature. Ainsi une synergie existerait entre le VRSB et le virus de la maladie des muqueuses. Les deux virus se potentialiseraient mutuellement, provoquant une aggravation des signes cliniques (84).

Cependant, malgré les nombreuses études qui rapportent l'existence d'associations, il est difficile d'évaluer leurs fréquences et leurs effets pathogènes. Mais il paraît de plus en plus probable que l'association de plusieurs agents infectieux, situation la plus fréquente sur le terrain, est à l'origine d'une augmentation de la sensibilité des animaux envers ces agents pathogènes.

Il nous reste à envisager une dernière cause de troubles respiratoires chez les bovins : le parasitisme.

4 . LA COMPOSANTE PARASITAIRE DES TROUBLES RESPIRATOIRES DES BOVINS

De toutes les infestations parasitaires des bovins, celle à *Dictyocaulus viviparus* est la plus néfaste pour l'appareil respiratoire.

4.1 . *Dictyocaulus viviparus*

La dictyocaulose bovine, très pénalisante, était répandue par le passé. Elle semblait maîtrisée par l'utilisation de traitements nématocides en cours de saison de pâture mais l'avènement, depuis quelques années, de molécules à action rémanente ou de système de libération périodique ou continue a réduit le contact des jeunes avec le parasite. Le déficit immunitaire alors enregistré a entraîné en France l'apparition de nombreux épisodes cliniques sur des animaux adultes.

4.1.1 . *Taxonomie – Principales caractéristiques*

Dictyocaulus viviparus est un nématode dont le cycle monoxène est constitué d'une phase exogène, de la larve L1 à la larve L3 et d'une phase endogène, de la larve L3 au parasite adulte (18).

4.1.2 . *Pouvoir pathogène*

Une action mécanique et irritative est provoquée par différents stades du dictyocaulose au cours de sa phase endogène. En effet, la larve L3 traverse la paroi de l'intestin pour rejoindre les ganglions mésentériques où elle se transforme en larve L4. Le transport vers le poumon s'effectue par voie lymphatique, jusqu'au cœur droit puis par voie sanguine. La larve traverse alors les capillaires et les alvéoles entraînant une inflammation, un emphysème interstitiel et une alvéolite nécrosante. La migration vers les bronchioles des parasites adultes entraîne une bronchiolite et une obstruction avec effondrement possible des alvéoles. La présence dans les alvéoles d'œufs et de larves provoque l'épithélialisation des alvéoles ainsi qu'un œdème et un emphysème. La ponte et l'éclosion s'effectuent alors dans les voies aérifères. Des efforts respiratoires accompagnés de toux et suivis d'une déglutition permettra le passage des larves

L1 dans le tube digestif pour leur élimination (18). Les lésions pulmonaires ont pour conséquence un surmenage cardiaque qui, en retour, aggrave ces lésions.

Une surinfection bactérienne est toujours possible dans les lésions pulmonaires établies par le parasite.

Enfin, une réinfestation forte d'animaux ayant une immunité déjà bien établie peut provoquer une pneumonie allergique parfois fatale.

4.1.3 . Epidémiologie

4.1.3.1 . Sources et réservoirs de parasites

Les sources de parasites sont les bovins infestés malades ou porteurs latents. Ainsi, un veau absorbant 200 L1 héberge environ 70 adultes et excrète journallement, après 30 jours, 2,5 millions de L1 dans les fèces (106).

Les larves infestantes survivent peu de temps dans le milieu extérieur. La plupart succombent en un mois lors de conditions climatiques variables. Chez l'hôte, la vie des adultes ne semble pas dépasser, le plus souvent, deux mois et demi mais elle atteint 6 mois dans certains cas permettant la survie à l'hiver. On observe alors un allongement de la durée du séjour des L4 dans les ganglions mésentériques des animaux surinfestés et une hypobiose des jeunes L5 dans le parenchyme pulmonaire (13).

4.1.3.2 . Mode de contamination

L'infestation se produit toujours par voie buccale, essentiellement par la consommation d'herbe au pâturage et plus rarement par l'ingestion de larves L3 dans l'eau de boisson (13).

4.1.3.3 . Facteurs sensibilisants

Classiquement, la bronchite vermineuse est une maladie de jeunes bovins en première saison de pâturage apparaissant d'une manière souvent imprévisible mais habituellement début juillet ou début septembre. Le niveau de contamination de l'herbe ne devient dangereux qu'après réensemencement massif par des jeunes animaux infestés dans le courant du

printemps par des larves dispersées par des porteurs latents plus âgés, souvent des génisses (26).

Un climat doux et humide favorise les infestations. Le surpeuplement des parcelles, le mélange d'animaux « naïfs » et d'animaux plus âgés ou une mise au pré trop précoce avec récupération d'un plus grand nombre de L3 ayant survécues à l'hiver sont également des causes favorisantes (13).

4.1.4 . Tableau clinique

La forme la plus fréquente est la bronchite vermineuse proprement dite. On observe d'abord une polypnée et de la toux pendant une à deux semaines avant que la maladie ne s'installe dans une phase d'état correspondant à la présence de nombreux vers adultes dans la trachée et dans les bronches. La toux est quinteuse, sèche et douloureuse puis devient plus grasse. Le jetage est peu abondant et surtout observé lors des quintes de toux. Il peut alors contenir des paquets de vers. La dyspnée peut alors aller jusqu'à des accès de suffocation, malades debout, membres écartés, tête étendue, naseaux dilatés, langue pendante, yeux exorbités. Le malade tombe sur le sol, présente quelques mouvements désordonnés puis retrouve une respiration normale après une quinte de toux.

A l'auscultation, on entend les nombreux râles muqueux d'une bronchite exsudative. Bien sûr, des troubles généraux accompagnent ces symptômes respiratoires : baisse de l'appétit, amaigrissement. En l'absence de traitement, l'évolution amène à la mort en plusieurs semaines. Une surinfection bactérienne peut accélérer l'évolution fatale (13).

A côté de la dictyocaulose, les autres parasitoses de l'appareil respiratoire des bovins sont anecdotiques.

4. 2 . Les autres helminthoses respiratoires

Un certain nombre d'helminthes, ascarides ou strongyloïdes, transitent par les voies respiratoires avant de rejoindre le tube digestif, siège de leur localisation définitive. Ce passage s'accompagne ou non de manifestations pathologiques qui sont consécutives au traumatisme tissulaire aggravé par des phénomènes immunopathologiques si les larves

subissent dans le parenchyme pulmonaire une mue ou si elles y meurent. Dans les deux éventualités il y a une sensibilisation de l'organisme qui répondra lors des réinfestations ultérieures et extériorisera cette réponse par des troubles pulmonaires peu spécifiques (26).

Les agents susceptibles de provoquer des troubles respiratoires chez les bovins sont nombreux. Les signes cliniques ne permettent pas le diagnostic étiologique. Or pour mettre en œuvre le bon traitement (choix de l'antibiotique) et/ou la bonne prévention (vaccination), il est nécessaire d'identifier le ou les agent(s) responsables. Le prélèvement de liquide trachéo-bronchique par aspiration transtrachéale permet cette identification.

II . REALISATION DE L'ASPIRATION TRANSTRACHEALE

Avant d'étudier les différentes méthodes d'aspiration transtrachéale qui se sont succédées au cours du temps, nous nous proposons de revenir sur l'anatomie de l'appareil respiratoire des bovins.

1 . RAPPELS ANATOMIQUES

Nous ne décrivons pas ici les voies aériennes supérieures mais seulement les parties de l'appareil respiratoire concernées par l'aspiration transtrachéale telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui. Nous décrivons donc le tractus respiratoire depuis la trachée jusqu'aux poumons (19).

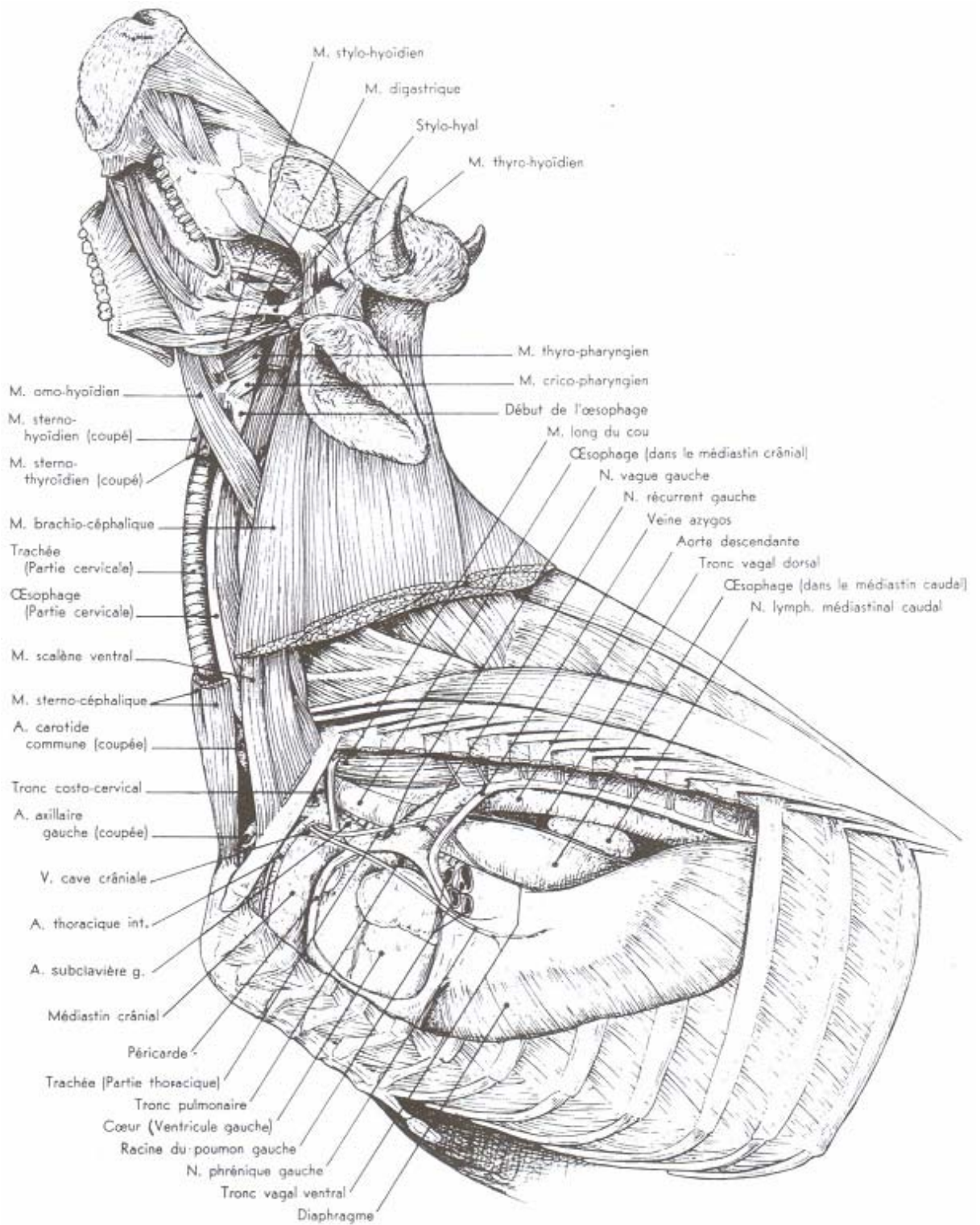
1.1 . L'arbre trachéo-bronchique

1.1.1 . La trachée

Elle est formée de 45 à 60 anneaux cartilagineux à l'intérieur desquels s'attache le muscle trachéal (figure 1). Son diamètre transversal est inférieur à 4 cm, alors que verticalement, il excède souvent 5 cm. Pour un bovin pesant 450 à 500 kg, la trachée mesure environ 3 cm de large pour une longueur de 95 cm. En raison de la relative étroitesse de la trachée, la vitesse de passage de l'air respiratoire est proportionnellement plus élevée que dans les autres espèces, ce qui peut contribuer éventuellement à l'augmentation de l'imprégnation de l'épithélium trachéal par les éléments contaminants de l'air.

Dans la moitié crâniale de son trajet cervical, la trachée de bovin est croisée latéralement par les muscles sterno-basilaire et omo-hyoïdiens. Dans la moitié caudale, elle est enveloppée ventralement par les muscles sternaux. L'accès le plus direct à la trachée se situe dans la limite du tiers crânial et du tiers moyen du cou sur une surface en losange très allongée, délimitée en avant par les deux muscles omo-hyoïdiens et en arrière par les deux muscles

Figure 1 : Trachée de bœuf avec ses rapports anatomiques principaux (6).



sterno-céphaliques. Sur le plan médian, la trachée est accompagnée par les muscles sterno-hyoïdiens et sterno-thyroïdiens.

La trachée est longée dorsalement par l'œsophage puis celui-ci est fortement dévié à gauche dans la moitié caudale du cou. A l'entrée de la poitrine, la trachée remonte légèrement pour se placer dans le médiastin crânial. Elle se termine au-dessus de l'atrium gauche, un peu à droite du plan médian.

Cinq ou six centimètres avant sa bifurcation terminale, la trachée porte sur sa face droite la bronche lobaire crâniale droite, dite « bronche trachéale », caractéristique des Ruminants.

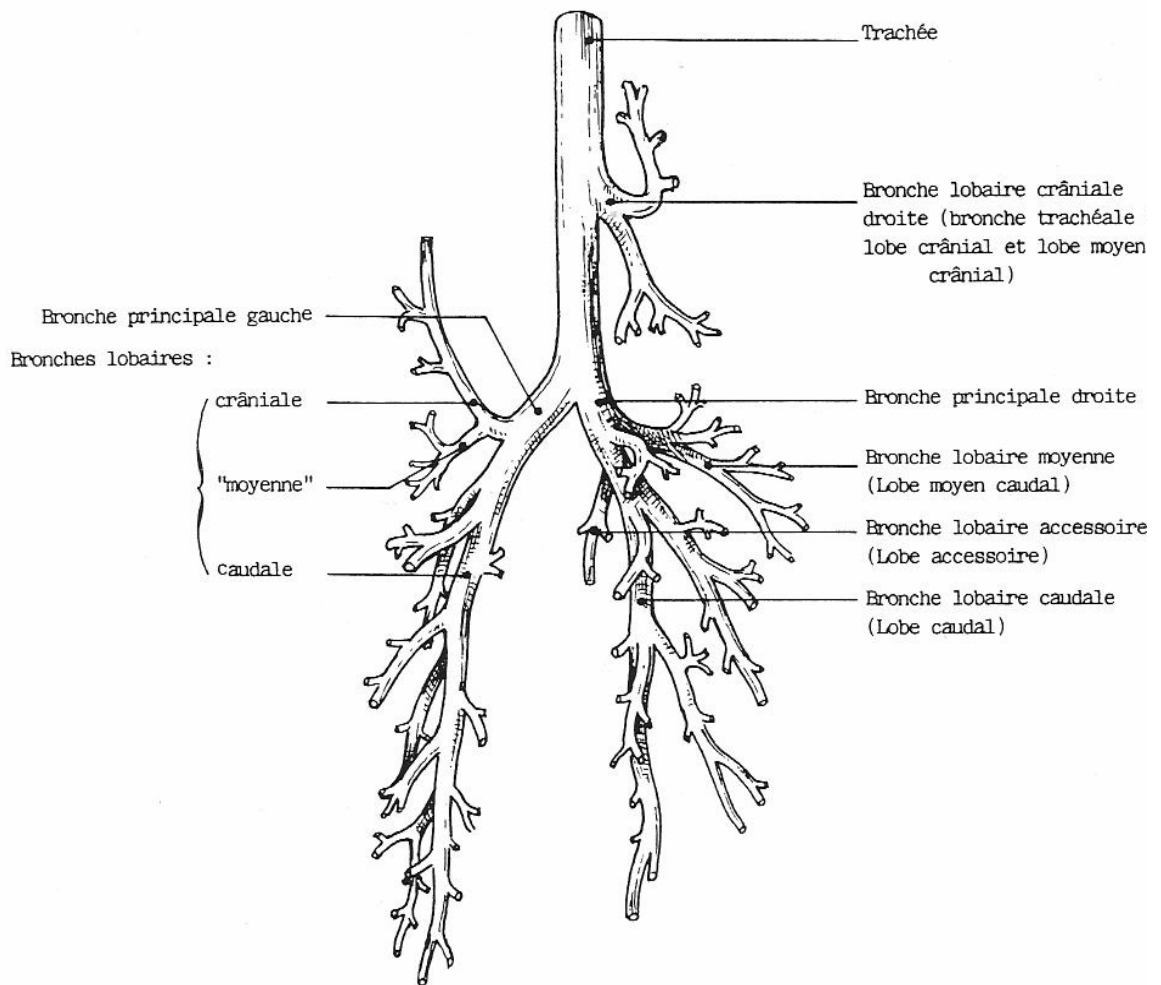
1.1.2 . Les bronches

L'arbre bronchique des bovins est dissymétrique en raison de la présence d'une bronche trachéale isolée et très développée (figure 2). La bronche principale droite, un peu moins large que la gauche, se divise presque immédiatement en une bronche lobaire moyenne droite et une bronche lobaire caudale. A l'origine de cette dernière, se trouve le départ de la bronche lobaire accessoire. La bronche principale gauche se divise très rapidement en une bronche lobaire caudale et un tronc commun donnant une bronche lobaire crâniale et une bronche lobaire moyenne.

La structure des bronches est comparable à celle de la trachée. Elle comporte une membrane fibro-élastique soutenue par une charpente cartilagineuse discontinue, le tout revêtu extérieurement par du tissu conjonctif et intérieurement par une sous-muqueuse. Cette structure se simplifie au fur et à mesure que l'on progresse vers les bronchioles terminales.

L'épithélium est formé de cellules prismatiques hautes et ciliées, mêlées de cellules caliciformes. Les éléments contaminants de l'air inhalés sont retenus par le mucus et ramenés vers le larynx par les cellules épithéliales ciliées. La vitesse du flux muco-ciliaire peut être ralentie par dégénérescence des cellules épithéliales en présence de gaz irritants ou d'agents infectieux et par augmentation, dans le même temps, du nombre des cellules à mucus.

Figure 2 : Voies aériennes de bovin : arbre bronchique (19).



L'innervation des bronches provient des nerfs vagues et du sympathique. La partie terminale de l'arbre bronchique est beaucoup plus sensible que la trachée.

1.2 . Poumons et plèvre

1.2.1 . Les poumons

Chaque bronche lobaire, flanquée de ses vaisseaux et nerfs, se divise dichotomiquement jusqu'à épuisement dans les alvéoles pulmonaires. Le parenchyme pulmonaire se trouve ainsi divisé en une série de territoires individualisés par la ramescence bronchique. Cependant, ces zones de ventilation plus ou moins indépendantes, ne sont pas morphologiquement identifiables à la surface du poumon. Par contre, il existe un cloisonnement conjonctif sous-pleural qui peut être à l'origine de scissures profondes (qui n'atteignent pas le hile pulmonaire) et qui divise le parenchyme pulmonaire en un certain nombre de lobes.

Le poumon droit (figure 3) représente 55 à 65% du volume pulmonaire total. Il comporte un lobe caudal (le plus épais), un lobe accessoire (médial), des lobes moyens caudal et crânial et enfin un lobe crânial. Le poumon gauche (figure 4) est divisé en trois lobes : caudal, moyen et crânial.

L'unité de base respiratoire du poumon correspond à la zone desservie par une bronchiole terminale (lobule primaire). Les bronchioles terminales se divisent ensuite en bronchioles respiratoires peu développées, puis en conduits alvéolaires, sacs alvéolaires et alvéoles pulmonaires.

La structure des poumons de bovin est caractérisée par le très grand développement des travées interlobulaires, envahies par un riche réseau lymphatique, et la très importante compartimentation des alvéoles pulmonaires. En effet, les pores interalvéolaires n'existent qu'irrégulièrement dans cette espèce, et ne concernent que 10% du septum.

Cette compartimentation peut prédisposer à l'hypoxie ou l'anoxie périphérique lorsque des conduits aérifères sont obstrués. Il en résultera, dans la région lésée, une rétention ou une multiplication des agents infectieux. De plus, on ne trouve que peu de macrophages dans la

Figure 3 : Poumon gauche de bœuf (6).

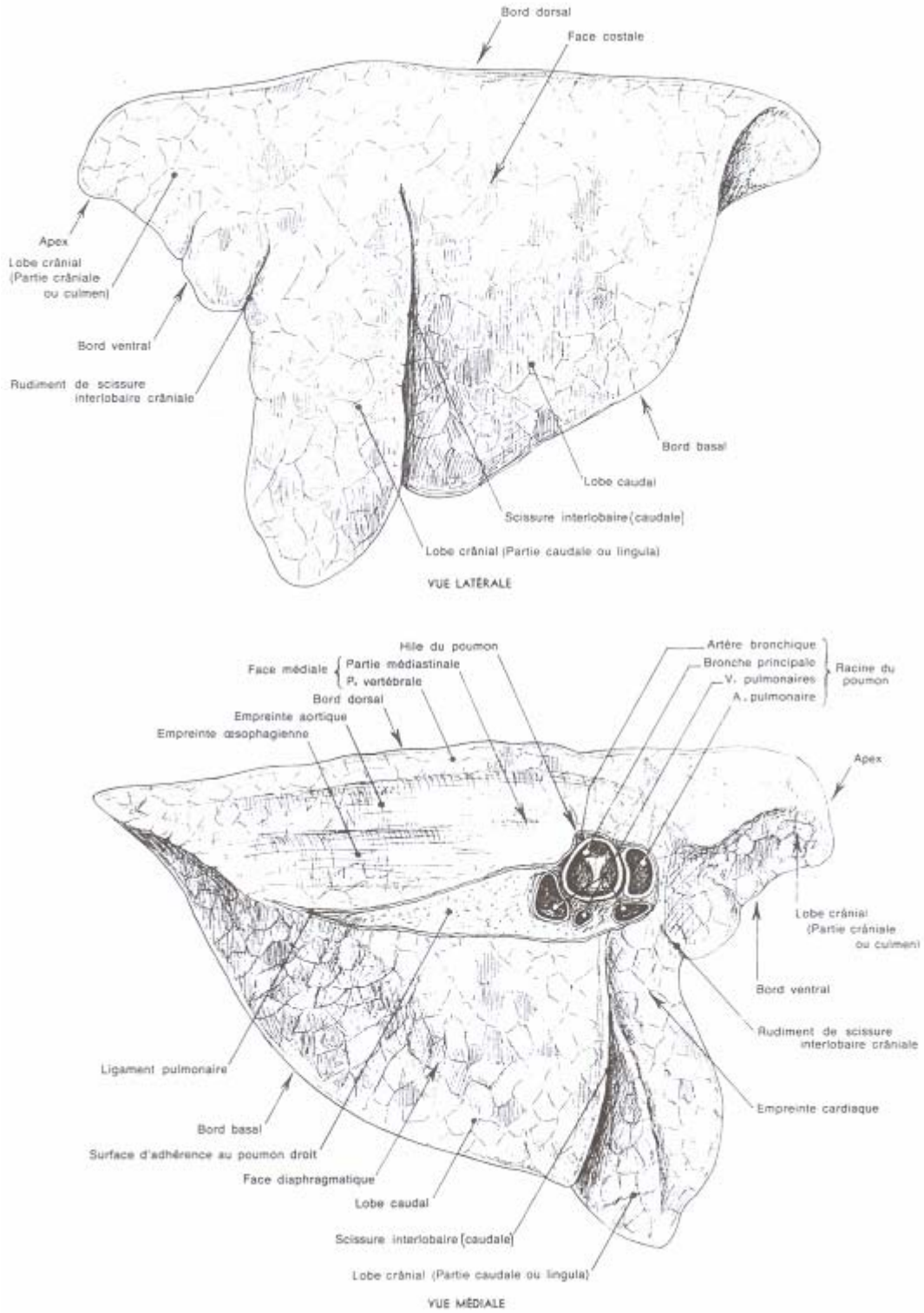
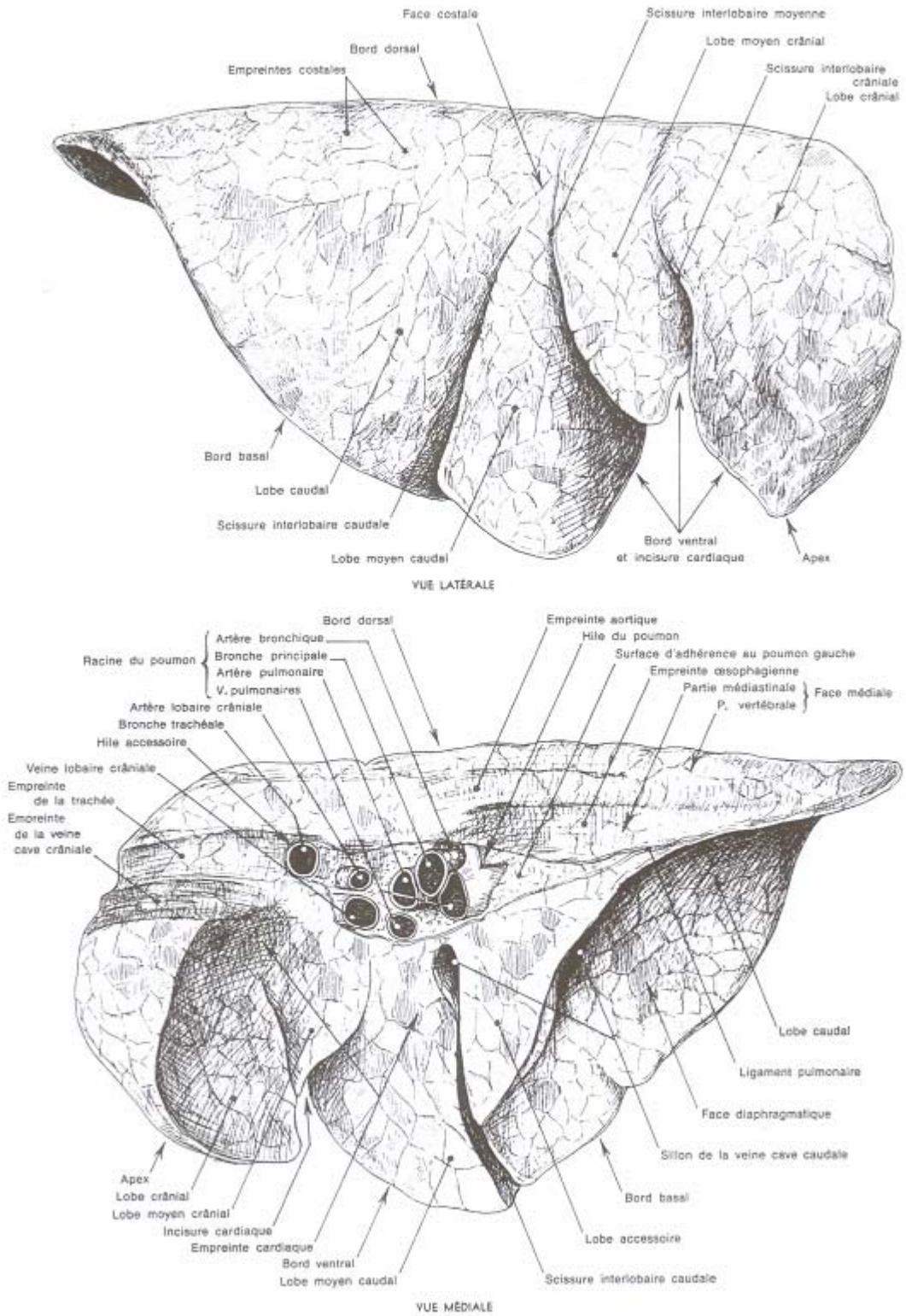


Figure 4 : Poumon droit de bœuf (6).



lumière alvéolaire ou dans les conduits alvéolaires des bovins à l'état normal. Cette rareté pourrait expliquer la prédisposition du bétail à développer des maladies respiratoires aiguës. On pense enfin que les lobes crâniens des poumons des bovins étant moins directement irrigués que les lobes caudaux, ils seraient moins bien oxygénés, ce qui entraînerait une baisse de l'activité phagocytaire des macrophages alvéolaires et un ralentissement du pouvoir d'élimination des agents infectieux dans ces zones.

1.2.2 . La plèvre

La plèvre pulmonaire, épaisse et résistante, adhère étroitement au parenchyme et forme un ligament pulmonaire net et court. Elle délimite avec la plèvre pariétale la cavité pleurale, virtuelle à l'état physiologique, qui ne se matérialise que dans un état pathologique.

La plèvre pariétale, également résistante, comprend la plèvre costale, la plèvre diaphragmatique et la plèvre médiastinale.

2 . LES DIFFERENTES METHODES D'ATT

L'aspiration transtrachéale, ou ATT, est une méthode de lavage broncho-alvéolaire. Mais contrairement aux autres méthodes employées, par voie buccale ou par voie nasale, elle permet d'éviter le passage dans les cavités nasales, le pharynx et le larynx pour pénétrer directement dans la trachée.

De nombreuses étapes, de nombreuses modifications ont été nécessaires entre les premières réalisations d'ATT et l'acte que chaque praticien peut réaliser aujourd'hui en clientèle.

2.1 . Ebauche d'une technique d'ATT adaptée aux bovins par Mac Laughlin et Miske (51)

Si l'ATT a été utilisée avec un intérêt diagnostique dès les années 60 en médecine humaine, il a fallu attendre 1974 pour voir décrite une méthode d'aspiration transtrachéale en médecine vétérinaire. Il s'agissait d'une étude menée par Creighton et Wilkins sur 87 chiens

afin d'évaluer la validité de l'ATT dans le diagnostic étiologique des pathologies respiratoires (22).

Quelques années plus tard, Mac Laughlin et Miske adaptent cette technique aux bovins et réalisent 81 ATT sur des veaux Holstein en bonne santé afin d'évaluer les éventuelles complications que cette technique aurait pu entraîner (51) .

2.1.1 . Matériel

Cette technique nécessite le matériel suivant :

- un cathéter externe en plastique, monté sur un trocart, dont le diamètre doit permettre le passage d'
- un cathéter interne en polypropylène de diamètre interne 1,2 mm et de longueur 56 cm ;
- une seringue stérile à usage unique de 12 ml ;
- une solution de lavage (sérum physiologique stérile) ;
- un anesthésique local injectable.

2.1.2 . Méthode

Le veau est maintenu debout ou couché sur le ventre, la tête et le cou en extension verticalement. La zone opératoire est tondue, désinfectée chirurgicalement et un anesthésique local y est injecté.

La trachée est empoignée et le cathéter externe introduit entre les anneaux cartilagineux de la trachée vers le bas jusqu'à ce que son extrémité soit positionnée dans la lumière trachéale. L'aiguille est ensuite retirée et le cathéter interne est rapidement introduit dans la trachée en passant dans celui qui vient d'être mis en place. On le fait progresser jusqu'à ressentir une résistance due à la bifurcation bronchique. Une toux réflexe est déclenchée. Le cathéter a alors parcouru 35 à 40 cm.

On injecte 10 ml de la solution de lavage dans les bronches à l'aide d'une seringue de 12 ml que l'on abouche au cathéter interne. Lorsque le veau tousse, on aspire du liquide jusqu'à l'obtention d'un volume d'échantillon suffisant.

On retire finalement les deux cathéters et on applique pendant deux minutes une compresse imprégnée de produit antiseptique sur le point de ponction.

La description succincte du procédé de Mc Laughlin et Miske (51) dans leur article nous éclaire sur le côté innovateur de leur démarche. Ils déconseillent d'ailleurs ce type de prélèvement pour des animaux présentant une grave insuffisance respiratoire ou une toux excessive.

Cette expérience reste la première adaptation aux bovins de l'ATT, déjà utilisée sur les chiens et les chevaux, et nécessitera quelques améliorations avant d'aboutir à une utilisation de routine.

2.2 . Technique de Viso, et al (110)

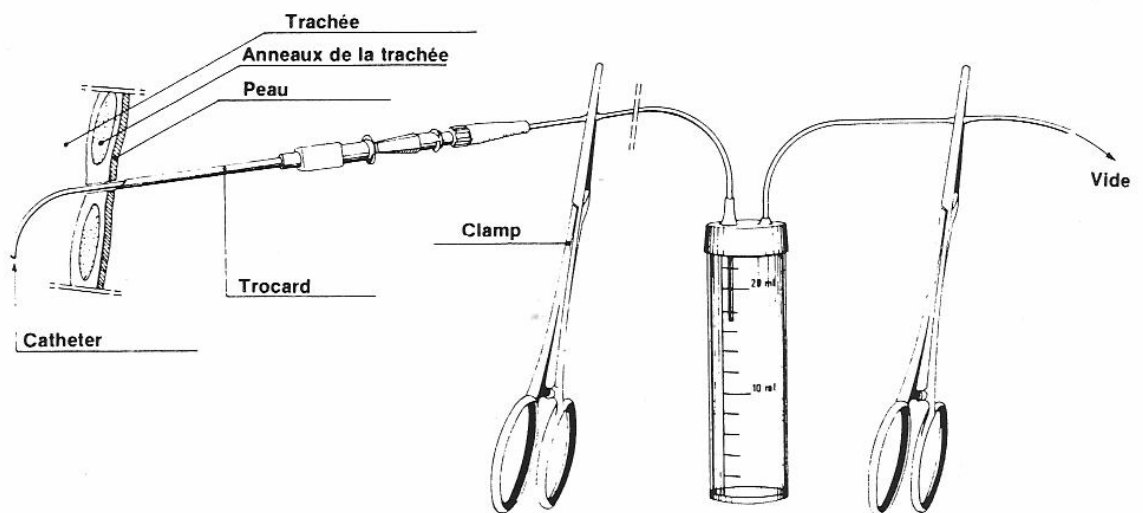
Viso, et al ont mis au point et développé en 1983 cette technique d'ATT afin d'obtenir, aisément et avec une bonne innocuité, des prélèvements trachéo-bronchiques sur le terrain, exploitables au laboratoire (109 ; 110).

2.2.1 . Matériel

Cette technique nécessite le matériel suivant (figure 5):

- un cathéter veineux Centracath VygonND (Vygon, Ecoenen, France) de 1,5 mm de diamètre interne et 50 cm de long ;
- une pompe à vide classique ou pour trachéotomisés ;
- des pots stériles à capuchons ponctionnables ;
- des seringues stériles de 30 à 50 ml ;

Figure 5 : Montage pour un prélèvement par aspiration transtrachéale (110).



- 30 ml de sérum physiologique stérile ;
- deux clamps ;
- des gants stériles ;
- un rasoir, de l'alcool iodé ;
- un réchaud à gaz.

2.2.2 . *Méthode*

L'animal debout est fermement contenu, si possible dans un travail, la tête en extension, par un aide à l'aide d'une pince mouchette ou mieux avec un licol et directement à la main.

Le lieu d'élection de la ponction trachéale est situé à la limite du tiers moyen et du tiers inférieur de l'encolure. La région est rasée puis lavée avec de l'alcool iodé. L'opérateur se munit de gants stériles après avoir aseptisé ses mains.

Dans un premier temps la peau est ponctionnée par le trocart du cathéter, puis la trachée solidement maintenue. Le trocard est implanté perpendiculairement entre 2 anneaux. Le cathéter est alors introduit dans la trachée après avoir pris soin de bien diriger le trocart vers le bas. Le cathéter est en place lorsqu'il a progressé de 40 cm environ. A ce moment, le trocart est retiré de la trachée.

L'opérateur injecte dans le cathéter 30 ml de sérum physiologique stérile, tiédi à la flamme du réchaud, et raccorde prestement au cathéter le pot à prélèvement branché sur la pompe à vide. Les clamps assurant l'étanchéité sont enlevés et le cathéter retiré lentement. La majeure partie du liquide est récoltée au passage de la position la plus déclive de la trachée.

Avant que le cathéter ne soit complètement retiré de la trachée, les clamps sont remis en place. La plaie minime est traitée avec un antiseptique sous forme d'aérosol.

Dès son obtention, l'échantillon doit être manipulé stérilement. Le bouchon qui a permis l'aspiration est alors remplacé par un bouchon de transport à côté d'une flamme (réchaud à

gaz). Enfin, le pot est identifié à l'aide de l'étiquette prévue à cet effet sur laquelle on note le numéro de l'animal, la date, l'heure, le nom du propriétaire et du vétérinaire traitant.

Cette technique, apparemment simple, a néanmoins recours à un matériel très spécialisé puisqu'il faut disposer d'une pompe à vide. De plus, ceci nécessite une installation électrique dans le champ d'action ou du moins quelques mètres de rallonge de fil électrique. Ces considérations pratiques sont suffisamment contraignantes pour dissuader les praticiens d'une utilisation courante en exploitation.

Une simplification du matériel et de la méthode a alors été envisagée par Zundel et al (116).

2.3 . Technique de Zundel, et al (116)

Etant eux-même praticiens, Zundel, Lamblin et Gouffe ont tenté de proposer une technique d'ATT réalisable par tout vétérinaire et dans toutes les conditions d'élevage.

2.3.1 . Matériel

Cette technique nécessite le matériel suivant :

- un cathéter veineux Orx-Centracath VygonND (Vygon, Ecoen, France) stérile de 75 cm de long et 1,5 mm de diamètre interne (référence 137/20);
- des seringues stériles excentrées de 50 ml ;
- des tubes secs siliconés stériles de 5 ml, pour récolter le prélèvement ;
- des aiguilles stériles ;
- 100 ml de sérum physiologique stérile ;
- du matériel de préparation et de désinfection de la zone opératoire.

2.3.2 . Méthode

Les premiers temps de cette méthode sont identiques à ceux décrits par Viso et al. Par contre, l'opérateur injecte un volume plus important de sérum physiologique, soit 50 ml, puis aspire les mucosités à l'aide de la même seringue. La quantité de liquide recueilli varie entre 1 et 10 ml. Si le prélèvement n'est pas assez abondant, on peut réinjecter 50 ml de solution physiologique stérile et aspirer à nouveau.

Une fois le cathéter retiré de la trachée, on débranche la seringue et, à l'aide d'une aiguille stérile neuve, le liquide de prélèvement est introduit dans un tube stérile fermé que l'on identifie ensuite.

Au vu des résultats bactériologiques, cette technique aussi fiable que celle de Viso et al. utilisant une pompe aspirante.

2.4 . L'ATT telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui

Pas à pas les techniques précédentes ont été améliorées et simplifiées jusqu'à aboutir à la méthode suivante qui permet à chaque praticien motivé de réaliser un examen simple, rapide, fiable avec des moyens humains et matériels accessibles à tous.

2.4.1 . Matériel

Le matériel n'a guère évolué depuis celui décrit par Zundel et al (29 ; 66; 116) :

- un cathéter veineux stérile de 75 cm de longueur, de 1,5 mm de diamètre interne. Le modèle le plus couramment utilisé est l'ORX-CENTRACATH de marque VYGONND (Vygon, Ecoen, France)(référence 137-20) ;

- une seringue stérile de 50 ml ;
- une poche de liquide physiologique (NaCl à 0,9%) ;
- des aiguilles stériles ;
- des tubes à prélèvements stériles de 5 ml type Vacutainer ;

- des gants propres à usage unique;
- une tondeuse, du coton et un désinfectant iodé.

2.4.2 . Méthode (29 ; 53 ; 66 ; 96)

2.4.2.1 . Contention et positionnement de l'animal

Quelque soit l'âge et la taille de l'animal, aucune sédation n'est nécessaire. Un veau peut être tenu par un assistant alors qu'un taurillon ou un adulte sera placé dans une cage de contention ou maintenu dans un cornadis. Une corde autour des cornes et une pince mouchette permettent d'attacher la tête en hauteur afin que l'encolure se trouve en extension modérée et que la tête reste dans l'axe du corps. Un licol suffit pour la contention d'un veau (figure 6).

La trachée et ses anneaux sont facilement palpables à mi-hauteur de l'encolure.

Figure 6 : Contention d'un taurillon.



2.4.2.2 . Préparation

Le site de ponction est situé dans le plan médian du cou, à la limite des tiers moyen et inférieur. La zone est largement tondu à la tondeuse électrique, puis lavée et désinfectée avec un dérivé iodé. Une anesthésie locale semble inutile. Avant de pratiquer la ponction, l'opérateur se lave et se désinfecte les mains, geste qu'il renouvelle s'il pratique plusieurs ATT.

2.4.2.3 . Ponction et pose du cathéter

Le praticien s'agenouille en avant de l'animal. La trachée, maintenue par la main gauche, est palpée par la main droite pour rechercher l'espace existant entre deux anneaux.

Le cathéter protégé dans sa gaine plastique et muni de son trocart est d'abord sorti de son étui d'emballage. Le trocart est ensuite désolidarisé du cathéter avant son utilisation et 50 ml de chlorure de sodium sont préparés dans la seringue stérile.

L'opérateur traverse la peau avec le trocart dans un premier temps, le biseau dirigé vers le bas. Dans un second temps, il place l'extrémité du trocart contre la trachée et perfore celle-ci perpendiculairement à son axe (figure 7).

Sans lâcher la trachée, un mouvement de basculement de la paume de la main gauche incline le trocart vers le bas, et la main droite peut alors pousser la cathéter dans la trachée, sans forcer et en dépliant au fur et à mesure la gaine de protection stérile.

Le passage du carrefour trachéobronchique est marqué par une toux assez forte. Le cathéter est alors introduit sur quelques centimètres supplémentaires. Selon l'âge et la taille des animaux, il se trouve alors enfoncé de 40 à 70 cm au total (figure 8).

2.4.2.4 . Lavage trachéobronchique

50 ml de soluté de chlorure de sodium, préparé dans la seringue stérile, sont alors injectés dans le cathéter assurant le lavage trachéobronchique de la zone concernée. Immédiatement après, l'opérateur aspire une partie du liquide injecté. La quantité de liquide ainsi récupéré

Figure 7 : Ponction de la trachée.

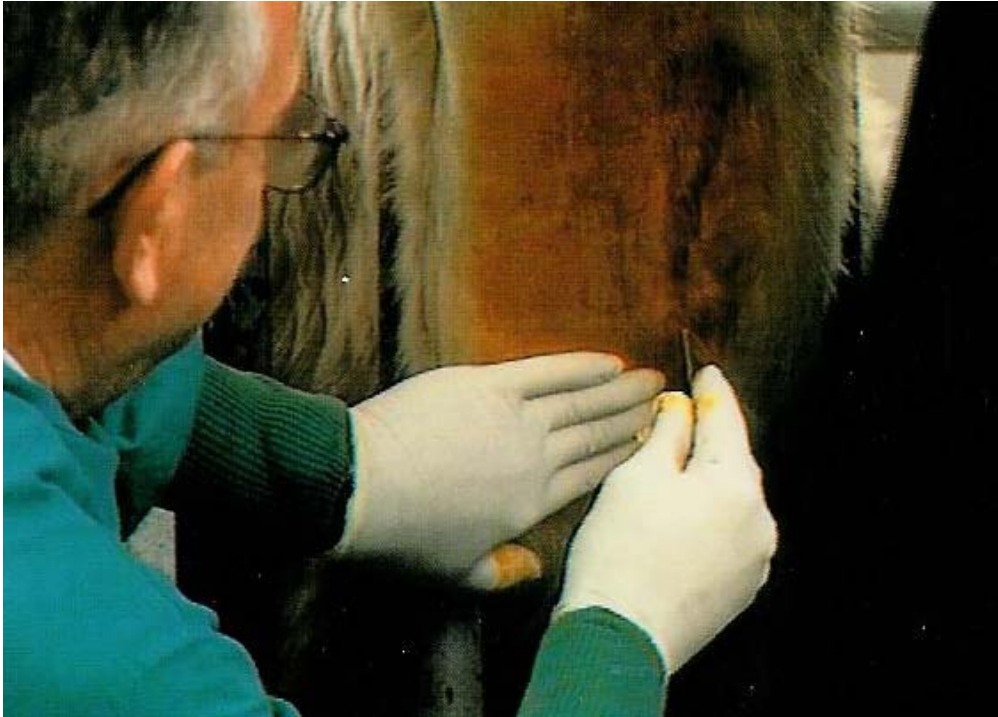
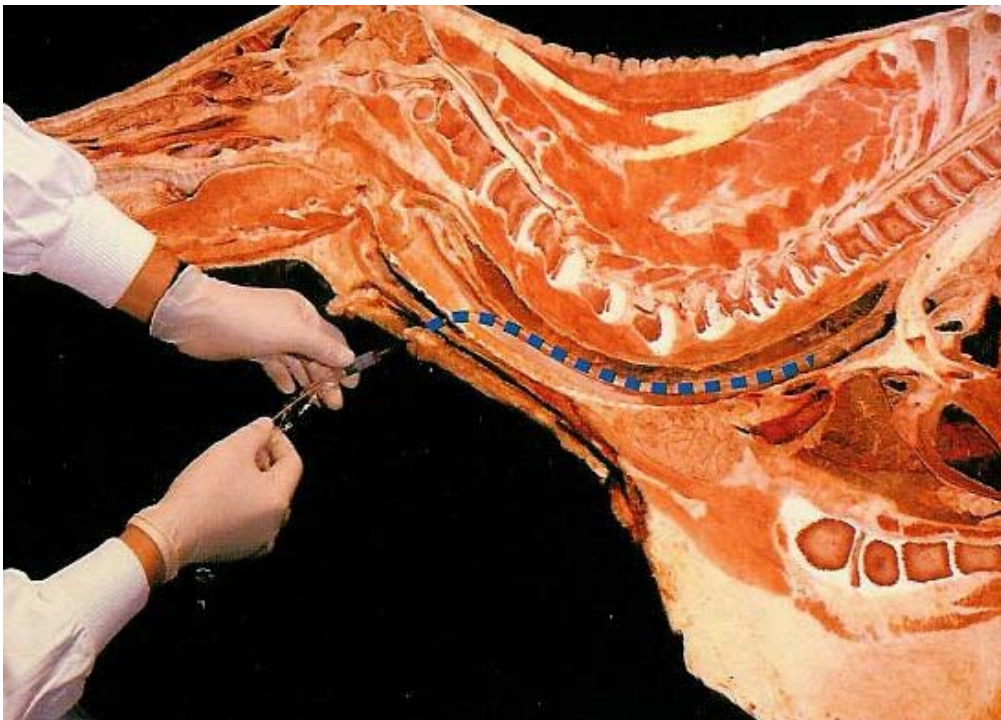


Figure 8 : Trajet du cathéter et injection du soluté (25).



varie de 1 à 10 ml, avec une moyenne de 2 à 3 ml. L'aspect trouble et muqueux du liquide signifie que celui-ci ne représente pas uniquement le volume résiduel de soluté contenu dans le cathéter et que le prélèvement est réussi. Dans le cas contraire, on peut, sans risque pour l'animal, réinjecter 50 ml de chlorure de sodium stérile et aspirer de nouveau.

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

2.4.2.5 . Conditionnement du prélèvement

Le prélèvement est alors introduit dans le tube stérile prévu. Soigneusement identifié, il sera acheminé dans un délai très court (inférieur à 24h) au laboratoire d'analyses. Au préalable, on aura pris soin de l'amener à la température de conservation, 4°C, au réfrigérateur. Il sera alors enveloppé dans une substance absorbante et mis dans un sachet plastique afin d'éviter les chocs et les fuites en cas de bris. Le tout est installé dans une petite boîte isotherme avec un conservateur de froid et une fiche de commémoratifs complets dont le détail est donné plus loin dans ce travail. Au laboratoire, seront réalisés l'isolement, l'identification et l'antibiogramme des germes présents.

Il est également possible de remplir un tube EDTA pour réaliser une cytologie. Il devra être traité rapidement, idéalement dans la demi-heure qui suit le prélèvement, sinon il sera conservé au réfrigérateur. Un liquide de conservation, comme l'alcool à 90°, peut être ajouté si le prélèvement doit être conservé plusieurs heures (33).

2.4.3 . *Quelques conseils pratiques*

La mise en place d'un licol à l'aide d'une corde, pour assurer une bonne immobilisation de l'animal, est préférable à l'utilisation de la pince mouchette qui stresse le bovin.

Lors de ses premiers prélèvements, le praticien pourra estimer la longueur de cathéter nécessaire en l'appliquant le long de l'encolure, sans le sortir de l'emballage, et en mesurant la distance entre la zone de ponction et l'entrée de la poitrine.

Le passage de la paroi trachéale doit théoriquement se faire entre deux anneaux trachéaux mais la traversée d'un anneau n'a pas de conséquence pour l'animal. Il faut juste effectuer une pression plus forte sur le trocart.

Lors de la ponction de la trachée, il vaut mieux marquer un temps d'arrêt dès le percement du cartilage afin de ne pas traverser la trachée de part en part.

La présence de sang dans le prélèvement n'a aucune importance. Par contre il doit parvenir impérativement au laboratoire le plus vite possible. Il est alors intéressant que l'éleveur ou que le vétérinaire en personne puissent l'acheminer juste après la réalisation de l'ATT.

L'aspiration transtrachéale, telle que le protocole ci-dessus la présente, est réalisable par n'importe quel praticien voulant se lancer dans l'aventure. Elle ne nécessite que peu de matériel et peu de main d'œuvre. Elle peut d'autant plus facilement trouver sa place dans la pratique quotidienne d'une clinique rurale que le temps opératoire est bref. Le prélèvement s'exécute, en effet, en 15 à 20 minutes. Les contraintes les plus importantes résident dans le traitement de l'échantillon. Du respect du mode de conservation optimale et de la rapidité d'acheminement sur les lieux d'analyse dépendront la validité des résultats.

III . DEVENIR DES PRELEVEMENTS D'ASPIRATION TRANSTRACHEALE AU LABORATOIRE

Le prélèvement obtenu par aspiration transtrachéale contient des sécrétions et des cellules libres, présentes dans la trachée et les grosses bronches, qui autorisent des analyses cytologiques, virologiques et bactériologiques. Les données qui en résultent seront soumises à interprétation avant d'être utilisées sur le terrain.

1 . TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON AU LABORATOIRE

Parmi les examens réalisables sur les échantillons collectés, seule la cytologie apparaît abordable au sein du cabinet. Les examens virologiques et bactériologiques imposent, eux, le recours aux laboratoires extérieurs. Dans la majorité des cas, les Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD), en raison de leur proximité géographique et de leur compétence, sont les partenaires privilégiés du vétérinaire praticien. Le Laboratoire National de Pathologie Bovine (LNPB) de l' AFSSA de Lyon reçoit également de nombreuses demandes d'analyses soit des LVD soit directement du vétérinaire praticien. Il s'agit alors essentiellement d'examens après isolement comme l'identification d'un mycoplasme ou le sérotypage d'une pasteurelle (34).

Les agents infectieux présents dans le prélèvement peuvent être mis en évidence directement, par isolement en culture ou par identification de leurs antigènes ou de leurs caractères morphologiques, ou indirectement par la recherche des anticorps témoins de l'infection.

1.1 . Etude cytologique

La connaissance des populations cellulaires présentes dans un prélèvement d'aspiration transtrachéale permet d'orienter le diagnostic de nombreuses affections respiratoires avant la

mise en évidence d'un agent causal. Le matériel nécessaire est peu coûteux, hormis le microscope, et présent dans de nombreux cabinets vétérinaires.

1.1.1 . Préparation de l'échantillon

Une centrifugation à basse vitesse est réalisée afin d'enrichir l'échantillon. Le culot est ensuite étalé sur une lame de microscope par écrasement, si le mucus est abondant, ou bien comme un frottis sanguin. En l'absence de centrifugeuse, l'enrichissement peut être obtenu par sédimentation. Le mucus présent dans le surnageant est également étalé. Plusieurs lames sont ainsi réalisées, fixées par simple agitation et colorées avec des colorations rapides de type May-Grünwald et Giemsa (33). Les lames, après séchage, peuvent également être fixées au méthanol et colorées à l'éosine et au bleu de méthylène (coffret Hémacolor, Merck, Overise, Belgique) (93).

1.1.2 . Méthode de lecture

Il est important d'examiner l'ensemble des lames réalisées et dans leur totalité, car les prélèvements peuvent être hétérogènes et de qualité variable. De plus, les cellules tumorales ou les parasites sont parfois rares.

La lecture des lames est réalisée en deux temps. Tout d'abord, le fond du frottis est examiné au grossissement x200, ce qui permet de rechercher la présence de mucus en abondance et une augmentation de la cellularité. La population cellulaire est ensuite examinée au grossissement x1000 et la recherche d'éléments anormaux, parasitaires, tumoraux (faible grossissement) ou bactériens (fort grossissement) est effectuée (104).

La connaissance de la cytologie chez un animal sain est indispensable à la recherche d'anomalies engendrées par la maladie.

1.1.3 . Cytologie chez animal sain

Dans le liquide issu d'une aspiration transtrachéale chez un animal sain, les macrophages alvéolaires sont les cellules majoritaires. Ce sont des cellules de grande taille, au noyau rond ou réniforme, généralement excentré. Leur cytoplasme est de couleur bleu-gris, abondant et

granuleux. Leur volume augmente lorsqu'ils sont activés et ils renferment alors des vacuoles et parfois du matériel phagocyté. Ils peuvent être plus nombreux en cas d'activation.

Les cellules épithéliales, bronchiques et trachéales, sont rares, et représentent moins de 1% de la population cellulaire dans le liquide recueilli. Elles peuvent être cylindriques ou cubiques, ciliées ou non. Leur noyau, rond ou ovale, est situé dans la partie basale de la cellule qui se termine souvent de manière effilée.

Des cellules à mucine, qui sont des cellules bronchiques, sont également observées. Elles sont généralement allongées, avec un noyau basal et un cytoplasme distendu par des granules à mucine. Elles sont peu nombreuses en temps normal mais une inflammation chronique entraîne une augmentation de leur nombre.

Les lymphocytes représentent moins de 10%, les neutrophiles et les éosinophiles de 5 à 10% de la population cellulaire. Des mastocytes peuvent également être présents en petit nombre à l'état normal (15 ; 33).

Une faible quantité de mucus est présente. Il forme des plages de substance amorphe bleue ou rose, ou de fins filaments emmêlés (33).

1.1.4. Modifications cytologiques observées sur un animal malade

Lors de processus inflammatoire, la quantité de mucus augmente. Il devient alors granuleux et se colore en violet (33). Les polynucléaires neutrophiles sont en quantité plus importante qu'à l'ordinaire, surtout si la cause est bactérienne. Dans ce cas, des neutrophiles dégénérés sont parfois observés. Si l'inflammation est chronique, des macrophages activés sont présents en plus et les cellules à mucine sont plus nombreuses (tableau 1).

Lors d'un phénomène d'hypersensibilité, comme lors d'une affection parasitaire, les polynucléaires éosinophiles représentent plus de 15% de la population cellulaire totale.

Lors de processus cancéreux, des amas de cellules jointives néoplasiques carcinomateuses ou de cellules rondes lymphomateuses peuvent être visibles (15 ; 104).

Tableau 1 : Caractéristiques semi-quantitatives des populations cellulaires présentes dans les liquides d'aspiration transtrachéale dans quelques cas d'affections broncho-pulmonaires (15)

	Broncho-pneumonie bactérienne	Broncho-pneumonie allergique	Broncho-pneumonie tumorale
Cellularité	N à ↗↗	N à ↗	N à ↗
Macrophages	N à ↗	N à ↗	N à ↗
Neutrophiles	↗↗↗	N à ↗	N à ↗
Lymphocytes	N à ↗	N à ↗↗	N à ↗
Eosinophiles	N	↗ à ↗↗	N à ↗
Autres cellules	-	Mastocytes	Cellules tumorales
<p>N : population cellulaire en quantité normale ↗ : population cellulaire en quantité augmentée ↗↗ : population cellulaire en quantité très augmentée ↗↗↗ : population cellulaire en quantité très augmentée et majoritaire</p>			

Cependant, quand un phénomène tumoral est suspecté, il est préférable de confier la lecture des lames à un spécialiste (15 ; 33).

L'étude cytologique renseigne donc le praticien sur la nature de l'affection respiratoire et lui donne une première direction quant à ses recherches étiologiques. Cependant, seule la recherche de l'agent causal est souvent demandée par le biais de la virologie et de la bactériologie.

1.2 . Etude virologique

La virologie est souvent limitée aux principaux virus, qu'ils soient des agents pathogènes majeurs comme le VRSB et le BHV-1, ou qu'une vaccination à leur encontre soit réalisable, comme le PI3 et le BVDV. On recherche également souvent les adénovirus.

Les tests de diagnostic direct les plus couramment utilisés font appel à l'isolement du virus sur cellules et à la recherche des antigènes spécifiques par immunochimie. L'isolement sur cellules suivi de l'identification des souches isolées par séroneutralisation ou immunofluorescence est la méthode de choix en raison de sa sensibilité (64).

1.2.1 . Isolement du virus sur culture cellulaire et identification des particules virales isolées sur cellules

La recherche du virus sur culture cellulaire ne peut être efficace que si les particules virales éventuellement présentes dans les prélèvements ont conservé leur pouvoir infectieux. Il est donc essentiel, rappelons-le encore une fois, de respecter les conditions optimales de réalisation et d'acheminement des prélèvements au laboratoire afin d'assurer la survie du virus (64).

1.2.1.1 . Méthode d'isolement sur culture cellulaire

L'isolement est fondé sur la propriété des virus d'infecter des cellules sensibles cultivées in vitro et d'y provoquer par leur multiplication des modifications physiologiques et morphologiques observables en microscopie optique et, éventuellement détectables par différents tests faisant notamment appel à des techniques d'immunochimie (64).

Après une phase de préparation consistant à séparer les particules virales des autres éléments constituant du prélèvement par dilacération ou remise en suspension et/ou centrifugations suivies ou non d'une filtration, les culots cellulaires obtenus sont inoculés sur cellules (64).

Les systèmes cellulaires les plus couramment utilisés en raison de leur sensibilité sont des cellules primaires de testicule de veau ou de rein de veau. Mais d'autres systèmes ont été décrits et peuvent être utilisés comme par exemple des cellules primaires ou secondaires préparées à partir de poumons d'origine bovine. Le système cellulaire utilisé doit au minimum présenter des garanties de sensibilité suffisante et de non-contamination microbienne (64).

Les inoculations sont pratiquées sur des tapis de cellules subconfluentes cultivées en plaques de microtitration ou en flacons de culture (64). Les cellules inoculées sont observées régulièrement en microscopie optique afin de détecter l'apparition d'effets cytopathogènes (ECP)(64).

En l'absence d'ECP 4 à 5 jours après l'inoculation, un second, voire un troisième passage sur cellules sont pratiqués afin de faciliter la multiplication des particules virales éventuellement présentes en très petite quantité (64).

Les puits où un effet cytopathogène se déclare sont prélevés et les antigènes viraux éventuellement présents caractérisés par les méthodes classiques de la virologie (110).

1.2.1.2 . Recherche de l'effet cytopathogène

Un effet cytopathogène désigne l'action des particules virales sur les cellules. Certains virus peuvent se multiplier en culture sans produire d'ECP. D'autres n'extériorisent cet ECP qu'après un nombre de jours élevé (8 à 10) ou après un certain nombre de passages en aveugle (34).

Dans le cas du BHV1, l'ECP se traduit par un arrondissement des cellules qui se regroupent en grappes et laissent autour d'elles des trous dans le tapis cellulaire, du fait de la rétraction du cytoplasme (64). Il se produit après deux à trois jours d'incubation. Mais cette technique appliquée au BHV1 doit être menée avec une grande rigueur du fait de l'existence

d'autres herpesvirus chez les bovins : le BHV2 responsable de la thélite infectieuse bovine, le BHV4 impliqué dans des affections du tractus génital femelle, ou le BHV5 impliqué dans des affections nerveuses (45).

En ce qui concerne le VRSB, une grande quantité de particules infectieuses est nécessaire pour sa mise en évidence en culture à partir du liquide d'ATT. Une grande quantité de cellules cibles infectées, représentées par les cellules épithéliales bronchiques, pneumocytes et macrophages alvéolaires, pourrait être obtenue après centrifugation d'un volume important de liquide d'aspiration : il conviendrait de renouveler l'aspiration plusieurs fois lors du prélèvement pour obtenir un volume suffisant (93). Mais l'isolement proprement dit de ce virus très labile est très difficile (94). De plus, les tentatives d'isolement en tout début d'infection n'ont pas apporté les résultats escomptés. En effet, les souches virales dans leurs premiers passages possèdent un effet cytopathogène lent et peu intense (5). Il faudrait donc réaliser le prélèvement entre le pic de température et l'apparition du jetage, soit entre 3 et 7 jours après l'infection. Les délais de réponses sont importants, allant de 4 à 5 semaines (54). Cette méthode diagnostique apparaît donc inutilisable en routine.

En revanche, pour le BVDV, l'isolement viral a longtemps été considéré comme la méthode de référence. Il est facile à isoler sur des cultures primaires de cellules embryonnaires, de cornets nasaux ou de cellules testiculaires bovines. Les souches cytopathogènes induisent des altérations cellulaires in vitro dans les 48 heures. Cependant, le plus souvent, les souches isolées du terrain sont non cytopathogènes (28).

Cette technique jouit d'une excellente spécificité et aussi d'une sensibilité meilleure que la recherche d'antigènes (54). Malgré cela, l'isolement viral est parfois long (48 à 72 h pour le BHV1 mais 4 à 5 semaines pour le VRSB), coûteux malgré la possibilité d'être multi-paramètres et réservé à des laboratoires pratiquant la culture cellulaire, c'est à dire disposant en permanence de cellules en multiplication exemptes de toute contamination virale.

Pour toutes les raisons décrites plus haut, l'isolement viral par recherche d'ECP est une méthode difficilement utilisable dans le diagnostic clinique. D'autant plus que les caractéristiques de l'effet cytopathogène observé après inoculation permettent uniquement d'orienter vers une famille virale déterminée, l'identification précise des particules virales

présentes dans les cellules inoculées devant nécessairement faire l'objet de tests complémentaires souvent d'ordre immunologique, ou moléculaire.

1.2.1.3 . Méthodes d'identification des particules virales isolées sur cellules

Deux méthodes peuvent être utilisées pour identifier les particules virales isolées, la séroneutralisation et l'immunochimie.

1.2.1.3.1 . Séroneutralisation

Cette méthode repose sur la capacité d'un sérum à inhiber le développement d'une souche virale sur une culture cellulaire. En pratique il s'agit de mettre en contact des dilutions décroissantes de la suspension de cellules infectées à tester avec une quantité constante d'un immunosérum monospécifique neutralisant d'une part et avec une quantité constante d'un sérum négatif vis-à-vis du virus concerné d'autre part. Si le virus est présent dans les cellules testées, il sera neutralisé par l'immunosérum. Le calcul des titres obtenus pour la série neutralisée et la série non neutralisée, puis de leur différence, permet de connaître l'index de neutralisation qui, s'il est supérieur à 2, permet de conclure à la présence du virus dans les cellules inoculées (64).

Ce test est relativement long à mettre en œuvre. Il nécessite 5 jours pour le VRSB (114) et 6 jours pour le BHV1 (45) et s'avère peu utilisable en pratique. On remarque en effet que dans les LVD, l'immunochimie est la technique la plus utilisée.

1.2.1.3.2 . Immunochimie

La technique d'immunofluorescence est la plus souvent pratiquée Elle peut être directe ou indirecte. Les antigènes viraux sont mis en évidence par application sur les cellules infectées d'anticorps spécifiques associés (IFD) ou non (IFI) à un fluorochrome, substance qui émet une lumière visible lorsqu'elle est excitée par la lumière ultraviolette. Il peut s'agir d'isothiocyanate de fluorescéine qui émet une lumière jaune-vert ou de rhodamine qui émet une lumière rouge. Enfin, il faut disposer d'un microscope à fluorescence (65). Si à l'issue de

l'IFD aucun marquage n'apparaît, l'épreuve comporte une seconde étape consistant à appliquer sur les préparations des immunoglobulines spécifiques de l'espèce ayant fourni les anticorps spécifiques et marquées par un fluorochrome. Cette seconde épreuve, dite d'immunofluorescence indirecte, est plus sensible que l'immunofluorescence directe, du fait du plus grand nombre d'anticorps susceptibles de se fixer sur les déterminants antigéniques. Les complexes immuns formés sont ensuite révélés par lecture au microscope à fluorescence en lumière ultraviolette. Les cellules infectées par le BHV1, par exemple, présentent une fluorescence verte caractéristique au niveau du noyau (intra et périnucléaire) (64).

Lors d'infections chroniques, des erreurs peuvent être liées à la présence d'un grand nombre de macrophages. Pour limiter l'ampleur de ces phénomènes, le manipulateur utilise un sérum anti-macrophage suivant la fiche de commémoratifs (47).

Par ailleurs, pour potentialiser l'examen effectué sur des prélèvements, plusieurs antisérums sont utilisés en routine lorsqu'un diagnostic étiologique est le but des analyses. Ces sérums sont dirigés respectivement contre le VRSB, le BHV1, le virus de la maladie des muqueuses (BVDV), le PI3 et les adéno-, rota- et coronavirus. Mais il est possible de se limiter aux seuls BHV1, VRSB et BVDV, compte tenu du faible intérêt en pratique des autres virus (absence de lutte spécifique, activité pathogène moindre de l'agent) (35).

Une autre technique de révélation est parfois utilisée : l'immunoperoxydase. Son principe est similaire à celui de l'immunofluorescence. Le marqueur est dans ce cas une enzyme, la peroxydase (44). Une coloration brunâtre granuleuse et diffuse apparaît dans le cytoplasme. La coloration est plus intense au niveau des inclusions virales ainsi qu'aux marges de certaines cellules (9). L'avantage de cette technique est qu'elle permet la mise en évidence des antigènes viraux même dans les cellules présentant une surinfection bactérienne. En revanche, elle est moins rapide que l'IFD et peu de laboratoires en France semblent la pratiquer.

On retrouve les deux méthodes décrites ci-dessus dans la littérature. Schreiber (93), par exemple, utilise une microplaque, dans une étude concernant la recherche de VRSB. Des culots cellulaires resuspendus sont appliqués sur des cellules sensibles, à savoir une lignée cellulaire VERO (fibroblastes de reins de singe vert d'Afrique) et une lignée cellulaire BFLD

(cellules diploïdes de poumons de fœtus bovin). Les cultures sont arrêtées après 4 jours, fixées au PBS-formol 2% et révélées avec un anticorps monoclonal anti-VRSB couplé à la peroxydase et avec un chromogène précipitant. Parallèlement, il cherchera le BHV1, le BVDV, le PI3 et l'adénovirus bovin de type 3 de la même manière sur des cellules VERO et sur des cellules MDBK (cellules rénales de bovins adultes) (93).

Six, en revanche, utilise, la technique de l'immunofluorescence directe pour le BRSV et celle de l'immunofluorescence indirecte pour les PI3 et les Coronavirus . Les antigènes viraux sont révélés par des anticorps monoclonaux (97). En pratique courante, l'isolement du BHV1 sur culture cellulaire est également très souvent associé à l'identification du virus par immunofluorescence indirecte.

L'immunochimie apparaît donc plus intéressante que la séroneutralisation de par sa mise en œuvre plus facile et la rapidité d'obtention des résultats. Par contre, elle doit être appliquée à des tapis de cellules encore peu détruits par le virus. Dans le cas contraire, en fonction de la qualité des immunsérums utilisés, des interférences avec certaines protéines cellulaires peuvent se produire rendant l'interprétation délicate et obligeant à faire appel à la séroneutralisation (64). D'autre part, l'immunochimie peut être utilisée indépendamment de l'isolement viral. Elle est dans ce cas plus rapide et plus performante que l'isolement viral par recherche d'effet cytopathogène (115).

L'immunochimie est également applicable directement au prélèvement sans culture cellulaire.

1.2.2 . Recherche des antigènes viraux par immunochimie

La recherche des antigènes viraux spécifiques peut être effectuée sur frottis de cellules obtenues par ATT. Elle n'exige pas le maintien de la viabilité du virus recherché.

Là aussi, la méthode la plus couramment appliquée est l'immunofluorescence. Au préalable, ce test nécessite des centrifugations successives avec lavage des culots cellulaires. Après lavage, les culots cellulaires sont étalés sur lames puis fixés à l'acétone (90). Comme pour la technique appliquée sur cellules infectées in vitro, il s'agit de mettre en contact avec le

frottis de cellules, des anticorps spécifiques associés (IFD) ou non (IFI) à un fluorochrome. Le déroulement de la manipulation est ensuite le même que pour les cellules infectées in vitro. L'épreuve d'immunofluorescence indirecte offre là encore une meilleure sensibilité que l'immunofluorescence directe, comme indiqué précédemment.

La présence d'antigènes spécifiques du virus BHV1, par exemple, se traduit sur lames traitées en immunofluorescence par des foyers de fluorescence vert brillant aux points de localisation des antigènes viraux dans les cellules épithéliales en position intra et périnucléaire (64).

Comparativement à la recherche virale sur cultures cellulaires, l'application de l'immunochimie sur frottis cellulaires permet d'obtenir rapidement et facilement un premier résultat. Cette méthode diagnostique manque en revanche de sensibilité et gagne à être complétée par un isolement sur cellules lorsque les résultats sont négatifs (64).

D'autres techniques voient le jour, comme la recherche de l'ADN spécifique, mais ne sont pas encore disponibles dans tous les laboratoires.

1.2.3 . Recherche de l'ADN spécifique

Aujourd'hui, la recherche d'ADN spécifique grâce à l'amplification génomique par PCR (Polymerase Chain Reaction) n'est plus expérimentale mais les protocoles des différents LVD sont encore en cours de validation. L'utilisation préalable de la technique d'amplification du fragment d'ADN recherché qui consiste à réaliser un certain nombre de cycles de dénaturation de l'ADN puis une hybridation à l'aide d'amorces, suivie de l'action d'une enzyme thermostable à l'origine de la polymérisation de l'ADN, permet d'amplifier la cible recherchée et donc d'obtenir un gain important de sensibilité (108).

Par rapport à l'isolement viral, la technique d'amplification génomique par PCR présente une meilleure sensibilité, un délai d'obtention des résultats plus court et une viabilité du virus facultative. Cependant, cette technique est sensible aux contaminations pouvant être à l'origine de résultats faussement positifs. D'autre part, son coût d'application reste élevé (64).

Simultanément à la virologie, le laboratoire met en route l'analyse bactériologique du prélèvement.

1.3 . Etude bactériologique

Tous les LVD effectuent les analyses bactériologiques de routine, y compris les antibiogrammes et le sérotypage au moins partiel des salmonelles. La recherche des mycoplasmes bovins est moins fréquente mais est tout de même réalisée dans plus de la moitié des LVD. Les résultats d'une bactériologie sont fournis en 2 à 8 jours, 3 semaines s'il s'agit d'un mycoplasme.

1.3.1 . Milieux de culture

Suivant les laboratoires, les opérateurs et les études effectuées, diverses méthodes de mise en culture sont réalisables. Viso et al., par exemple, procédaient ainsi : le culot obtenu après le premier traitement du prélèvement est remis en solution dans de l'eau physiologique stérile par une agitation violente d'au moins 30 secondes (Vortex). Quand des amas coagulés sont présents, ils sont dilacérés à l'aide de pilons ou de tiges de verre stériles. La suspension obtenue est diluée dans du bouillon ordinaire de 10 en 10 jusqu'à 10^{-5} . Cinquante microlitres de chaque dilution (de 10^{-1} à 10^{-5}) sont déposés sur 3 boîtes de Pétri contenant de la gélose tryptose-sérum. L'inoculum est étalé à l'aide d'un rateau en verre stérile. Les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 48h (110). L'atmosphère sera enrichie en CO₂, indispensable à la culture d'*Histophilus somni* et favorable à la croissance de *A. pyogenes* sans influencer sur la culture des salmonelles (58). Les colonies sont dénombrées partout où il n'y a pas de confluence (110).

De même, de nombreux milieux d'ensemencement et de non moins nombreux milieux sélectifs permettent la détection des bactéries. Sans être exhaustive, la liste suivante présente quelques-uns des milieux utilisés :

- La gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton permet de déceler dès l'isolement le caractère hémolytique de la souche, premier caractère distinctif entre

P. multocida et *M. haemolytica* (73). Elle permet également de cultiver des colonies de streptocoques (8).

- La gélose Columbia enrichie de 10% de sang de cheval chauffé permet l'isolement d'*Histophilus somni* (8).
- La gélose Columbia plus vancomycine, amphotéricine B, amikacine et sang de mouton 5% est un milieu sélectif pour pasteurelles qui permet de réduire les éventuelles contaminations (97).
- Une gélose additionnée de sérum de cheval, extrait de levure, acétate de thallium et pénicilline est un milieu enrichi et sélectif pour mycoplasmes (97).
- Milieu oxoid (Biolyon, Dardilly, France) pour les mycoplasmes (8).

Finalement la gélose Columbia au sang de cheval placée en atmosphère enrichie en CO₂ à 10% et à 37°C est un milieu très permissif pour toutes les bactéries. Toutefois, elle présente l'inconvénient d'être rapidement envahie par une population quantitativement dominante ce qui peut rendre délicat le repérage et l'isolement d'autres souches.

1.3.2 . Identification des bactéries

L'identification des bactéries est réalisée grâce à l'aspect morphologique des colonies bactériennes.

Après 18 à 24 heures de culture sur milieu gélosé, *M. haemolytica* et *P. multocida* produisent des colonies circulaires, en goutte de rosée de 1 à 2 mm de diamètre. Les milieux translucides permettent l'examen par transillumination oblique qui révèle, chez les formes capsulées, une iridescence bleuâtre ou rougeâtre des colonies (58).

Les souches de *P. multocida* des sérogroupes A et D, les seuls existants en France, forment des colonies bombées et muqueuses (M) à l'isolement, devenant au cours des repiquages, lisses et irisées (S) puis rugueuses avec un contour irrégulier (R) . Seules les souches en phase M ou S produisent une capsule (58).

Les souches de *P. haemolytica* forment à l'isolement des colonies en gouttes de rosée. Une dissociation S-R correspondant à la perte d'antigènes de surface, peut s'observer à la suite des repiquages, dans les vieilles cultures mal conservées ou sur milieu inadéquat (58).

Le typage sérologique des pasteurelles fait intervenir des antigènes de surface absents chez les formes R, d'où l'importance d'une bonne conservation des souches, à l'obscurité et à température ambiante. Les souches bovines peuvent être envoyées au LNPNB qui assure le typage sérologique de *M. haemolytica* et le chimiogroupage capsulaire de *P. multocida* (58).

En ce qui concerne *Histophilus somni*, la taille des colonies n'excède pas 0,5 mm de diamètre après 24 heures de culture à 37°C sur milieu gélosé, sous atmosphère enrichie en CO₂. Elle atteint 1 à 2 mm après 48 heures d'incubation. Les colonies sont circulaires, lisses, pigmentées en jaune pâle (58).

Enfin, le poumon étant normalement stérile, la mise en évidence d'une bactérie potentiellement pathogène n'a pas a priori besoin d'être assortie d'un dénombrement.

L'identification des mycoplasmes, elle, n'est pas aussi aisée et nécessite des conditions particulières.

1.3.3 . *Le cas particulier des mycoplasmes*

Seul le diagnostic bactériologique est actuellement disponible en routine. Il repose sur l'isolement puis l'identification antigénique des mycoplasmes mis en évidence. La réponse est en moyenne obtenue dans un délai de 15 jours à 3 semaines.

1.3.3.1 . Mise en culture

Les mycoplasmes ont des exigences culturelles très particulières. Leur isolement requiert l'utilisation de milieux spéciaux de composition complexe. Ces milieux doivent contenir, entre autres, des inhibiteurs limitant la croissance des bactéries contaminantes, généralement de l'acétate de thallium et des β -lactamines, ou d'autres antibiotiques qui bloquent la synthèse des peptidoglycanes. En France, des milieux prêts à l'emploi spécialement conçus pour la recherche de mycoplasmes chez les ruminants sont disponibles dans le commerce. Ainsi la

recherche de mycoplasmes est actuellement réalisable sans grande difficulté dans n'importe quel laboratoire de diagnostic vétérinaire. Cet isolement nécessite 3 à 8 jours d'incubation à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ (81 ; 83).

Lorsque le nombre de mycoplasmes est faible, le pré-enrichissement est bénéfique pour améliorer le rendement de la culture. L'isolement d'*Ureaplasma diversum*, par exemple, nécessite un milieu spécial liquide contenant de l'urée et à pH 6,5. Ces micro-organismes métabolisent alors rapidement l'urée et produisent une forte augmentation de pH, ce qui se traduit par un changement de couleur du milieu liquide, alors que leur développement reste limité en milieu solide. Pour y remédier, l'ajout d'un tampon phosphate et de rouge phénol au milieu gélosé permet aux colonies d'uréaplasmes de se développer à une taille équivalente à celle des autres colonies de mycoplasmes. Le milieu sert alors de diagnostic pour les uréaplasmes, étant donné qu'un précipité se forme dans les colonies et que le milieu gélosé passe du jaune au rouge (83).

Les colonies apparaissent en général dans les trois à quatre jours qui suivent le début de l'incubation. Cependant, certaines colonies ne sont visibles qu'après une semaine ou plus (83). Elles sont petites et bien visualisées à l'aide d'un microscope stéréoscopique. Leur apparence typique en « œuf sur le plat » ou en « mamelon » est caractéristique (83). Mais la morphologie des colonies des différentes espèces mycoplasmiques diffère peu (78). L'isolement d'un mycoplasme n'a donc aucune signification pathologique. En effet, la présence de nombreuses espèces saprophytes non pathogènes comme *M. bovirhinis* ou *M. arginini* est fréquente, associée ou non à des mycoplasmes pathogènes. L'identification précise de *M. bovis* est donc obligatoire (81).

1.3.3.2 . Identification des mycoplasmes

L'identification des mycoplasmes se limite donc à savoir s'il s'agit ou non de *Mycoplasma bovis*, ce dernier étant le seul mycoplasme au pouvoir pathogène respiratoire connu (97).

Des tests biochimiques étaient utilisés pour identifier chaque espèce de mycoplasme. Ainsi, l'ajout de chlorure de triphényltétrazolium dans le milieu solide permettait d'obtenir

une coloration des colonies de *M. bovis* en rouge, en l'absence de coloration des colonies de *M. bovirhinis*. Avec une telle coloration, tous les autres mycoplasmes contaminants étaient incolores ou supprimés (1). Mais leur identification finale faisait appel à des tests d'immunofluorescence indirecte, d'immunoperoxydase et d'inhibition de croissance (83).

Toutefois, l'identification biochimique, longtemps pratiquée, s'avère très longue et source d'erreurs multiples. L'identification des mycoplasmes passe aujourd'hui nécessairement par une analyse antigénique, désormais parfaitement maîtrisée. Elle est réalisée par une technique immunoenzymatique sur membrane de filtration, le MF Dot (Membrane Filtration Dot immunobinding) à l'aide de sérums hyperimmuns polyclonaux spécifiques des différentes espèces fréquemment isolées chez les bovins (50 ; 80). Directement réalisée à partir des cultures, cette technique est spécifique et rapide (3 heures).

Actuellement, pour l'ensemble du territoire, cette identification des souches isolées dans les laboratoires périphériques est centralisée à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFFSA) de Lyon. Des méthodes alternatives telles que l'analyse des acides gras cellulaires et l'amplification génétique (PCR) y sont actuellement en cours de développement comme moyen de différencier les mycoplasmes.

On retrouve tous les examens de laboratoire décrits plus hauts dans le tableau 2. Ce dernier récapitule la valeur de ces examens en fonction des différents germes. Mais l'isolement de l'agent infectieux responsable d'une pathologie respiratoire n'est qu'une étape dans la lutte contre la maladie. Il faut encore que le praticien prescrive le traitement antibiotique adéquat, dans le cas d'une attaque bactérienne primaire ou secondaire, parmi la grande diversité de molécules à disposition et leurs multiples présentations. Le recours souvent anarchique à l'antibiothérapie et, en amont, à l'antibioprévention a abouti au fil des ans à sélectionner des bactéries devenues résistantes à divers antibiotiques. C'est pourquoi tout examen bactériologique demande à être complété par l'exécution d'un antibiogramme.

Tableau 2 : Nature et valeur des examens de laboratoire dans le diagnostic étiologique d'une pathologie respiratoire (89)

(IFI : immunofluorescence indirecte ; BHV1 : bovine herpes virus de type 1 ; VRSB : virus respiratoire syncytial bovin ; BVDV : Bovine Viral Diarrhoea Virus ; PI3 : virus parainfluenza de type 3)

	Recherche directe d'un agent causal par		
	Isolement sur culture	Détection d'antigène par IFI, immunoperoxydase	Morphologie
BHV1	+++	++	+/-
VRSB	0	+++	+/-
BVDV	++	++	0
PI3	++	++	+/-
Adénovirus	++	++	+/-
Mycoplasma	++ identification très spécialisée	0	0
M. haemolytica	+++	0	0
P. multocida	+++	0	0
S. pneumoniae	+++ identification spécialisée	0	0
Salmonella	+++	0	0
H. somni	++ isolement délicat	0	0
Dictyocaulus	0	0	+++
+/- : technique peu fiable ++ : technique fiable +++ : technique excellente			

1.4 . Réalisation d'un antibiogramme

L'antibiogramme est une aide ponctuelle précieuse à la prescription pour le clinicien. Il a pour but de l'assister dans le choix de l'antibiothérapie en précisant la probabilité de succès ou d'échec thérapeutique. Il doit aussi permettre la détection des résistances et la quantification du niveau de ces résistances. L'antibiogramme constitue également un outil irremplaçable de surveillance épidémiologique des bactéries pathogènes chez les bovins (60).

1.4.1 . Principe général (61)

Un antibiogramme permet d'apprécier l'activité inhibitrice des antibiotiques sur une souche bactérienne isolée en déterminant in vitro les concentrations minimales inhibitrices (CMI), c'est-à-dire les plus petites concentrations d'antibiotique capables d'empêcher toute croissance visible de la bactérie. Par définition, l'antibiogramme ne teste donc que l'effet bactériostatique des antibiotiques sur des bactéries en phase de multiplication active et dans des conditions in vitro bien standardisées.

Ces conditions standardisées permettent d'assurer la reproductibilité de l'épreuve dans le temps et dans les différents laboratoires. Dans de telles conditions, on peut comparer entre elles des collections de souches d'origines différentes, détecter des souches hautement résistantes ayant acquis des mécanismes particuliers de résistance, et suivre avec fiabilité l'évolution de ces résistances. D'autre part, la comparaison de CMI ainsi déterminées avec les concentrations sériques ou tissulaires obtenues en administrant chez l'animal les antibiotiques aux doses recommandées en fonction de leurs propriétés pharmacotoxicologiques permet d'augurer de l'efficacité d'un traitement.

1.4.2 . Méthodologie

1.4.2.1 . Epreuve de sensibilité

Les méthodes de dilution en milieu liquide ou gélosé, ainsi que les méthodes de diffusion à partir de disques imprégnés d'antibiotiques sont bien standardisées et permettent de travailler avec la plupart des bactéries rencontrées fréquemment en pathologie bovine.

Les méthodes de dilution permettent de déterminer directement la CMI en ensemençant avec un inoculum standardisé de bactéries une série de milieux de culture (généralement le milieu de Mueller Hinton) additionnés de l'antibiotique dilué selon une gamme de progression géométrique d'ordre deux. L'inoculum est standardisé dans les techniques officielles de façon à ce que les colonies apparues après 18 heures de culture soient juste confluentes. Dans la méthode de référence, le milieu est gélosé et l'utilisation d'un multi-inoculateur permet d'ensemencer plusieurs cultures bactériennes simultanément, ce qui facilite l'étude d'un antibiotique vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes. Mais, en raison de leur coût et de leur lourdeur, ces méthodes ne peuvent être systématiquement utilisées en routine pour le diagnostic.

Aussi, dans les laboratoires de bactériologie médicale, on cherche essentiellement à évaluer la sensibilité d'une souche suspecte vis-à-vis d'une gamme la plus étendue possible d'antibiotiques. La méthode de choix est donc la diffusion en milieu gélosé (figure 9). Le milieu de Mueller Hinton gélosé est ensemenché en nappe avec une suspension standardisée de la souche bactérienne, puis une série de disques antibiotiques est déposée au moyen d'un distributeur automatique. L'inhibition bactérienne se manifeste après 18 à 24 heures de culture à 37° C par des zones sans culture autour des disques. Lorsque la technique est réalisée dans des conditions rigoureuses, vérifiées au moyen de souches étalons, les diamètres des zones d'inhibition sont inversement proportionnels aux CMI des antibiotiques (61). Chaque laboratoire soumet sa technique à un étalonnage périodique au moyen de souches de référence donnant des zones d'inhibition de diamètres connus. L'Institut Pasteur, par exemple, utilise les souches *Escherichia coli* n7624, *Pseudomonas aeruginosa* n76110 et *Staphylococcus aureus* n7625.

Cependant l'antibiogramme standard par la méthode de diffusion à partir de disques imprégnés d'antibiotiques décrite ci-dessus, tel qu'il est pratiqué pour les bactéries pathogènes classiques dans le cadre d'un diagnostic, n'est pas applicable aux mycoplasmes (79). Il convient donc de se reporter aux résultats obtenus par la méthode des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Et il est parfois difficile de comparer les données obtenues par différents laboratoires car ce n'est qu'en 2000 qu'a été publié un recueil de recommandations pour l'harmonisation des méthodes de détermination des CMI des mycoplasmes animaux

(40). En outre, aucune prédiction d'efficacité, ou même d'inefficacité, n'est possible à partir des résultats des CMI. Les propriétés pharmacodynamiques de chaque molécule doivent être prises en compte pour la détermination des « valeurs critiques de CMI » qui permettent de classer les souches en trois catégories : sensibles, intermédiaires, résistantes (50).

Figure 9 : Principales étapes de réalisation d'un antibiogramme par la méthode de diffusion

- Préparation des boîtes de milieu gélosé (4 mm d'épaisseur)
- Séchage des boîtes 30 minutes à 37° C
- Préparation de l'inoculum
- Ensemencement en nappe
- Séchage 15 minutes à 37° C
- Application des disques antibiotiques
- Pré-diffusion 30 minutes à température ambiante
- Incubation 18 à 24 heures à 37° C
- Lecture
- Interprétation

L'antibiogramme standard est également impossible pour *H. somni* car il cultive mal ou pas du tout en atmosphère normale sur milieu Mueller Hinton. La sensibilité de ce germe ne pourra donc s'apprécier que par l'établissement de CMI par une méthode de dilution (58).

1.4.2.2. Interprétation de l'antibiogramme

La première interprétation d'un antibiogramme est thérapeutique. A partir des informations obtenues quant à la sensibilité des bactéries concernées vis-à-vis des antibiotiques, le praticien peut élaborer un plan d'action face à une situation clinique donnée. Pour cela, les valeurs obtenues à l'épreuve de sensibilité (CMI ou diamètre de la zone d'inhibition) sont comparées à des valeurs critiques proposées par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Les souches bactériennes sont alors classées suivant leur résistance aux antibiotiques proposés : sensibles, intermédiaires, résistantes. Cependant, les valeurs références ont été établies sur des résultats obtenus en clinique humaine et l'application de ces valeurs critiques « humaines » entraîne parfois des résultats erronés.

Ensuite, une interprétation microbiologique est donnée. Elle consiste à repérer des phénotypes de résistance particuliers et d'en déduire, à partir des données déjà disponibles, la présence de mécanismes connus. Et si les phénotypes observés ne correspondent à aucun mécanisme décrit, on suspecte la présence d'un nouveau mécanisme.

Cette lecture de l'antibiogramme aboutit à un résultat synthétique plus riche en connaissances sur le comportement des bactéries et sur les conséquences en terme de thérapeutique. Ainsi, à partir des résultats obtenus dans les LVD, différents réseaux de surveillance de résistance aux antibiotiques concernant les bactéries les plus fréquemment isolées en France ont vu le jour et permettent aux praticiens d'orienter leurs traitements donnés en première intention (61).

Cependant, malgré tout l'intérêt que l'on doit porter à la lecture d'un antibiogramme, on doit toujours l'interpréter de manière nuancée. Il faut toujours garder à l'esprit que l'antibiogramme est une épreuve *in vitro* qui doit détecter des souches résistantes et que ce n'est jamais une « modélisation » *in vitro* d'un foyer infectieux *in vivo*. De nombreux facteurs tels que la biodisponibilité peuvent modifier la sensibilité de la bactérie *in situ* (34).

2 . INTERPRETATION DES RESULTATS DE LABORATOIRE

Comme l'expérimentateur doit s'assurer de la validité de ses témoins avant d'interpréter ses résultats, le demandeur d'un examen complémentaire devra s'assurer qu'il a bien rempli l'ensemble des conditions indispensables à l'utilisation du résultat. Après avoir défini ces conditions, nous nous pencherons sur quelques règles d'interprétation d'un résultat de laboratoire.

2.1 . Interprétabilité d'un test

Le diagnostic de laboratoire en général, et des troubles respiratoires des bovins en particulier, ne pourra apporter un élément complémentaire à l'irremplaçable examen clinique, que dans la mesure où les matériaux à partir desquels il est construit, c'est à dire les prélèvements et les commémoratifs, sont de bonne qualité (34). Il convient donc de respecter les conditions suivantes pour se garantir les meilleures chances de succès.

2.1.1 . Importance de l'examen clinique

Force est de souligner le caractère peu évocateur du tableau clinique sur le plan étiologique lors d'une pathologie respiratoire. Toutefois, un examen clinique complet (inspection, palpation, percussion, auscultation) permet d'apprécier la gravité de la maladie et de préciser la nature des lésions pulmonaires élémentaires (bronchite, pleurésie, emphysème...). Certaines observations cliniques permettent ainsi de réduire le champ des investigations (tableau 3). Une pleurésie, par exemple, permet, dans un premier temps, de suspecter une infection bactérienne.

L'observation de symptômes associés aux signes respiratoires sur le même bovin ou d'autres bovins du lot peut aussi orienter les examens de laboratoire et le diagnostic. Par exemple, des signes nerveux évoquant la méningo-encéphalite thrombosante imposent la recherche d'*Histophilus somni* et la présence de troubles articulaires peut faire suspecter une participation de *Mycoplasma bovis*. Par ailleurs, des symptômes digestifs diarrhéiques peuvent être observés dans de nombreuses infections à l'origine également de troubles respiratoires et nous orienter vers une infection à adénovirus, BVDV ou salmonelles.

2.1.2 . *Commémoratifs complets*

Les commémoratifs sont le trait d'union permettant le dialogue entre le vétérinaire praticien et le laboratoire. Ils doivent orienter les recherches et donner une signification aux résultats. La fiche de renseignements doit accompagner les prélèvements, dans une enveloppe séparée, de manière à ce qu'elle ne soit pas souillée lors d'un éventuel bris du tube.

Les renseignements à fournir sont d'abord d'ordre général :

- coordonnées complètes de l'exploitant et de l'exploitation ;
- type d'élevage (lait, viande, mixte, atelier d'engraissement, nurserie...) ;
- importance numérique des diverses catégories d'animaux : vaches laitières, vaches allaitantes, veaux nés sur l'exploitation, veaux achetés, broutards, génisses, taurillons, taureaux ;
- type de bâtiment : étable traditionnelle, stabulation libre ou entravée, nombre d'animaux par case ;
- alimentation au moment de l'affection.

La suite des renseignements concerne plus précisément les animaux malades :

- race des animaux malades ;
- catégorie des animaux malades ;
- date du début de la maladie ;
- nombre de malades et, éventuellement, de morts à la date du prélèvement ;
- symptômes observés et description des lésions si une autopsie a été pratiquée ;
- thérapeutiques mises en place : nature et résultats
- vaccinations antérieures en rapport avec la maladie ;
- examens de laboratoire effectués antérieurement ou simultanément : nom du laboratoire et résultats.

Tableau 3 : Sémiologie des affections respiratoires (89)

SYMPTOMES	AFFECTIONS							
	Affections cavités nasales	Affections du larynx	Trachéo-bronchite	Broncho-pneumonie	Pleurésie	Emphysème	Oedème aigu	Pneumo-thorax
Souffle expiratoire	Force ↗ si obstruction Parfois odeur de nécrose		0		0	0	0	0
Toux	0	Fréquente, forte, sèche Facilement provoquée	Fréquente, forte, sèche Parfois humide si exsudat abondant Facilement provoquée	Fréquente, petite, humide	Fréquente, petite, douloureuse	Petite +/- sèche	Petite, humide avec expectoration mousseuse	Rare, sèche
Jetage	Abondant Latéralisation éventuelle	0	+/-	+/-	0	0	Mousseux +/- sang	0
Cornage	Reniflement inspiratoire	Râle inspiratoire	Bourdonnements (très rares)	0	0	0	0	0
Polypnée, dyspnée	+/- Inspiratoire discrète à forte, selon le degré d'obstruction	+ Inspiratoire Très souvent forte	+ Inspiratoire d'intensité variable	+ Le plus souvent mixte : inspiratoire et expiratoire	+ Type abdominal Plainte expiratoire possible	+ Type abdominal	++ Très sévère Plainte expiratoire possible	+/- Type abdominal Plainte expiratoire possible
Palpation pression	0	Larynx Exacerbation : dyspnée Cornage, Toux, Frémissement possible	Trachée Exacerbation de la dyspnée Toux si exsudat abondant	Thorax Toux (rare)	Thorax Douleur, toux éventuelle	0	0	0

Percussion du thorax				Dans certains cas : matité	Parfois douleur, avec toux, Matité	Hypersonorité, ↗ aire de percussion	0	Douleur, Hypersonorité unilatérales
Auscultation		<p>Larynx</p> <p>Intensité ↗, Ronflement, sifflements inspiratoires</p> <p>Poumon</p> <p>conduction des bruits laryngés</p>	<p>Trachée</p> <p>Intensité ↗</p> <p>Thorax</p> <p>Intensité ↗, Sifflements possibles, en particulier inspiratoires</p> <p>Pas de crépitements</p>	<p>Thorax</p> <p>Intensité ↗, Bruits surajoutés inspi. et expi. fréquents : sifflements expiratoires, crépitements possibles, resp. soufflante si zones densifiées</p>	<p>Thorax</p> <p>Si exsudat abondant, bruits respiratoires ↘</p> <p>Frottements pleurétiques</p>	<p>Thorax</p> <p>Crépitations</p>	<p>Thorax</p> <p>Crépitements abondants</p>	<p>Dissymétrie nette</p> <p>Hémithorax atteint : ↘ bruits respiratoires</p> <p>Hémithorax sain : ↗ intensité bruits respiratoires</p>

Toutes ces indications permettent de construire le contexte épidémiologique de l'affection. Même si celui-ci ne permet pas de définir avec précision le ou les germes en cause, il s'avère souvent très utile pour établir préalablement une suspicion clinique.

Si l'on prend l'exemple d'un emphysème pulmonaire, consécutif à une atteinte bronchique grave de type obstructif ou occlusif, le contexte épidémiologique réduit les hypothèses diagnostiques. Ainsi, sur un veau de 6 à 10 mois au pré, on évoquera plutôt une dictyocaulose alors que pour le même animal élevé en stabulation, la mise en cause du VRSB sera davantage plausible.

Enfin il est indispensable pour le praticien de faire une demande explicite des recherches nécessaires au laboratoire.

2.1.3 . Choix des animaux prélevés

Le choix des animaux est capital pour la réussite du prélèvement. Tout d'abord, il convient de choisir des animaux qui sont vierges de tout traitement anti-infectieux afin de tester l'antibiosensibilité d'une éventuelle contamination bactérienne. On a ainsi toutes les chances d'isoler la bactérie native qui n'a pas subi de pression de sélection d'un antibiotique quelconque (90).

Ensuite, le moment de la réalisation de l'ATT par rapport à la maladie est primordial. Il est indispensable d'intervenir, en particulier pour les recherches virales, dans la phase fébrile initiale de l'infection, alors que les agents initiateurs sont encore dominants (78). En effet, dans la plupart des infections virales, on constate, expérimentalement, que les titres sont faibles les deux premiers jours, augmentent ensuite rapidement, persistent à des valeurs élevées pendant 4 à 5 jours et se négativent au bout de dix jours parallèlement à l'apparition des anticorps (90). Ces observations sont d'autant plus justes pour le VRSB qu'il est un virus très labile (94). Le praticien devra donc préférer prélever, au sein d'un lot d'animaux élevés ensemble, les animaux en phase d'hyperthermie avec une température supérieure à 40°C plutôt que les bovins malades présentant un tableau clinique complet (hyperthermie, baisse de l'état général, toux, fréquence respiratoire élevée, bruits audibles à l'auscultation) ou évoluant depuis quelques jours (16).

A l'inverse, il est nécessaire que les animaux présentent des signes cliniques de maladie lors du prélèvement si l'on veut identifier des bactéries dans le liquide d'ATT (67). Néanmoins la durée écoulée depuis l'apparition des symptômes respiratoires doit être raisonnable pour augmenter les chances d'isoler les bactéries véritablement à l'origine de la maladie et non des germes opportunistes, jouant un rôle dans l'évolution de la maladie mais d'un intérêt moindre quant à l'établissement d'un traitement raisonné et efficace.

Il est également préconisé de prélever un nombre suffisant de bovins, soit au moins trois par lot ou bien 20% des animaux (90). Ces prélèvements peuvent être « poolés » par le laboratoire sans perte de sensibilité, limitant ainsi les coûts d'analyse (53).

2.1.4 . Bonne qualité du prélèvement

La qualité du prélèvement est surtout influencée par le délai et les conditions d'acheminement au laboratoire. Il faut que le prélèvement soit acheminé rapidement sous protection du froid, sans congélation car les pasteurelles se conservent très mal sous un froid négatif. Il est donc déconseillé de congeler un liquide d'ATT. On estime que les résultats sont valables dans la mesure où le traitement des prélèvements est effectué dans la journée même, toujours sous protection du froid (87). Dans le cadre d'une recherche unique de mycoplasmes, une congélation du prélèvement est envisageable pour différer l'analyse (81).

Cependant, même si toutes ces conditions sont réunies, les résultats du laboratoire ne doivent pas être validés in extenso. Il faut les analyser avec un œil critique.

2.2 . Interprétation d'un résultat négatif

2.2.1 . Résultat bactériologique négatif

L'absence d'isolement de bactérie ne permet pas de conclure que l'affection étudiée au travers du prélèvement reçu n'est pas d'origine bactérienne. L'usage d'antibiotiques non avoué sur les animaux ou des conditions d'acheminement du prélèvement déficientes peuvent être à l'origine de ce résultat négatif.

Il faut aussi évoquer le cas des mycoplasmes. Les méthodes d'identification sont encore très largement basées sur la reconnaissance d'antigènes spécifiques du pathogène à l'aide de serums dirigés contre l'ensemble des protéines du micro-organisme. Ces serums contiennent principalement des anticorps anti-Vsps qui, compte tenu de l'expression variable des Vsps par *M.bovis*, peuvent conduire à des faux négatifs et une interprétation erronée des résultats. Par exemple, une culture présente des colonies de mycoplasmes après incubation avec un sérum anti-*M.bovis* conventionnellement utilisé pour le diagnostic et révèle des colonies positives et négatives. Une première interprétation de ce résultat serait de conclure à la présence de plusieurs espèces de mycoplasmes, dont *M.bovis*, au sein de l'échantillon. En fait, la culture analysée ne contenait que *M.bovis*, la présence des colonies négatives étant imputable à la variation d'expression des Vsps. Ces problèmes peuvent survenir dans la plupart des analyses utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre les Vsps (86).

2.2.2 . Résultat virologique négatif

Lorsqu'aucun virus n'est isolé du prélèvement, deux hypothèses s'opposent. On pourrait déduire simplement que l'affection n'est pas virale. Mais il est possible également que le prélèvement ait été effectué à une phase trop tardive de la maladie. Le virus ne peut alors plus être mis en évidence car il est masqué par le développement bactérien secondaire ou déjà neutralisé par les anticorps spécifiques produits par le bovin. De mauvaises conditions de conservation et d'acheminement du prélèvement ont également pu hâter la disparition du virus qu'il contenait (34).

2.3 . Interprétation d'un résultat positif

2.3.1 . Résultat bactériologique positif

Un liquide prélevé par ATT chez un animal sain est habituellement stérile. Quand on isole une bactérie dans les voies respiratoires profondes, cela signifie qu'elle a réussi à surmonter tous les mécanismes de défense bronchiques. Il s'agit donc d'une bactérie réellement capable d'envahir l'appareil respiratoire, à la suite d'un stress thermique, par exemple, ou après l'initiation d'un état réceptif par un virus respiratoire ou par *Mycoplasma bovis* (87).

2.3.2 . Résultat virologique positif

Lorsqu'un virus est isolé de l'échantillon, il est, dans la majorité des cas, la cause de l'affection, d'autant plus s'il est reconnu comme un pathogène majeur en pathologie respiratoire des bovins.

Il existe néanmoins un cas particulier dans la cadre de la latence du virus BHV1. En effet, les formes latentes de l'infection par le BHV1 peuvent être réveillées par une infection concomitante. Ainsi, la mise en évidence du virus chez un individu malade n'assure pas que le BHV1 est responsable des symptômes observés et les résultats des tests directs en matière de diagnostic de l'IBR doivent être validés avec prudence.

D'une manière générale, la mise en évidence d'un agent infectieux pneumotrope doit être interprétée en fonction du pouvoir pathogène de cet agent infectieux. En effet, nous avons vu dans une première partie que les virus BHV1 et VRSB, *M. haemolytica*, *Salmonella spp*, *M. bovis* peuvent être considérés comme des agents infectieux majeurs. D'autres, comme les virus BVDV et PI3, semblent être des agents initiateurs. Le pouvoir pathogène d'*Histophilus somni* et de *Pasteurella multocida*, par contre, mérite d'être mieux évalué. Les autres agents infectieux évoqués ont un rôle probablement mineur.

La mise en évidence d'un agent infectieux doit être également interprétée en fonction de la cinétique de la maladie. Ainsi, lors d'une maladie ancienne ou passée à la chronicité, l'absence de virus ne permet pas d'exclure sa possible intervention initiale. Pour le virus BHV1, par exemple, il a été démontré que l'effet favorisant sur le développement des pasteurelles persistait jusqu'à vingt jours après le début de l'infection virale (90).

Enfin, une façon sage d'interpréter un résultat positif serait sans doute de n'accepter comme significatifs que les résultats correspondant à une hypothèse diagnostique formulée préalablement.

Au cours des pages précédentes nous nous sommes appliqués à réaliser une étude critique de la réalisation et de l'utilisation du prélèvement d'ATT. Il s'agit maintenant de discuter la validité de l'aspiration transtrachéale par rapport aux autres examens complémentaires applicables à des bovins vivants à travers différents contextes d'utilisation.

IV . QUAND PRATIQUER UNE ASPIRATION TRANSTRACHEALE ?

Différents examens complémentaires, de réalisation plus ou moins facile et de coût plus ou moins élevé, sont à la disposition du praticien afin de préciser l'étiologie d'une affection respiratoire chez un bovin vivant. L'aspiration transtrachéale en fait partie. Mais on se doit d'évoquer également l'écouvillonnage nasopharyngé profond, le lavage bronchoalvéolaire et, plus simplement, la ponction sanguine qui apparaissent comme les prélèvements les plus couramment décrits et utilisés. Nous pourrions ainsi définir une utilisation réfléchie et optimale de l'ATT.

1 . LES ALTERNATIVES A L'ASPIRATION TRANSTRACHEALE

Les techniques suivantes visent toutes à réaliser des prélèvements sur un animal vivant afin d'effectuer des analyses de laboratoire, dont le but est de déterminer ou du moins de préciser l'étiologie de l'affection respiratoire .

1.1 . Ecouvillonnage nasopharyngé profond

L'écouvillonnage nasopharyngé profond (ENP) permet de recueillir des sécrétions et des cellules infectées de la partie distale des cavités nasales et du pharynx, pour examens microbiologiques.

1.1.1 . Matériel spécifique

L'écouvillon utilisé doit être assez long, au moins 30 cm. Il est même conseillé d'utiliser un écouvillon à métrite de jument qui, seul, permet un prélèvement suffisamment profond. On doit proscrire les écouvillons à manche de bois et tête de coton car ils réduisent la réussite des isolements bactériens et viraux. Des écouvillons en fibres de polyester favorise le brossage. (90). Quant au manche, on préférera une tige fine métallique ou une tige de plastique.

1.1.2 . Méthode

Comme pour l'ATT, il est important d'intervenir au tout début de l'hyperthermie ou des symptômes cliniques, ces derniers étant quelquefois le signe tardif et passé de l'excrétion virale par les voies respiratoires supérieures (37).

Préalablement au prélèvement, le mufler peut être nettoyé avec un tampon imbibé de sérum physiologique (34). L'écouvillon doit, ensuite, être enfoncé d'au moins 20 centimètres puis frotté vigoureusement sur la muqueuse. La qualité du prélèvement dépend de cette phase, puisque les recherches virales demandées dépendent de la quantité de cellules recueillies (53).

1.1.3 . Utilisation du prélèvement

Si le prélèvement n'est pas utilisé sur place, l'écouvillon doit être placé dans un milieu de transport qui le protégera contre la dessiccation, les fluctuations de pH et de température et fournira le plus souvent un milieu nutritif (7). Le délai d'acheminement doit être inférieur à 24h, si possible sous couvert d'un froid positif (53).

Les cellules épithéliales recueillies ainsi peuvent être étalées sur lame pour une recherche d'antigènes viraux après fixation dans l'acétone (90).

Le prélèvement est alors mis en culture pour un isolement viral avec recherche d'effet cytopathogène et/ou immunochimie. Dans la mesure où un milieu de transport a été utilisé, une recherche de bactéries ou de champignons est possible. Toutefois ce prélèvement est principalement utilisé pour des examens virologiques.

1.2 . Lavage bronchoalvéolaire

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) a pour objectif de prélever des sécrétions et des cellules bronchiques et alvéolaires.

1.2.1 . Matériel spécifique

Un lavage bronchoalvéolaire est réalisé à l'aide d'un fibroscope souple. Chez les bovins adultes, on utilise un endoscope de grande taille, d'une longueur de 2 m et de diamètre 12

mm. Chez le veau, en revanche, le diamètre de l'endoscope ne sera que de 8 à 9 mm (33). Le liquide de lavage le plus couramment utilisé est le soluté salé isotonique (90).

1.2.2 . Méthode

L'endoscope est généralement introduit dans le méat ventral des cavités nasales du bovin. Une anesthésie locale par aspersion de lidocaïne dans les naseaux est suffisante. Mais chez un animal de moins de 200 kg, le fibroscope peut être introduit par voie buccale. Il sera protégé par la mise en place d'un pas d'âne et d'un tube de plastique rigide. Idéalement, le fibroscope doit aussi être recouvert d'une gaine de plastique souple, interdisant les contaminations nasopharyngées et retirée après l'arrivée dans la trachée. Dans ce cas, le bovin est préalablement anesthésié à l'aide de kétamine (5 mg/kg en intra-veineuse). On limite ainsi les risques de réaction brutale de l'animal pouvant abîmer le matériel et blesser les voies respiratoires.

Une fois l'endoscope bloqué dans une bronche, du liquide de lavage stérile est introduit par le canal de l'endoscope (53). Le sérum peut être tiédi avant le prélèvement afin de limiter la toux (33). Après quelques secondes, le liquide est aspiré doucement, pour ne pas léser la muqueuse, à l'aide d'une seringue d'au moins 50 ml par les mêmes voies. Les pertes de fluide étant comprises entre 30 et 50%, il n'est pas nécessaire d'injecter un gros volume (53). Schelcher et al proposent d'injecter de 30 à 60 ml de sérum physiologique pour des recherches microbiologiques et 150 à 200 ml pour la cytologie (90).

1.2.3 . Utilisation du prélèvement

Les échantillons obtenus sont conditionnés et acheminés selon les mêmes règles que ceux obtenus par aspiration transtrachéale. Ils permettent la recherche d'agents infectieux (viraux, bactériens, mycoplasmiques et fongiques) et des examens cytologiques, biochimiques et immunologiques (53).

1.3 . Ponction sanguine – Sérologie

1.3.1 . Protocole

Deux types de prélèvements sanguins peuvent être réalisés. Le premier, dans un tube contenant un anti-coagulant type EDTA, est utilisé pour mettre en évidence une virémie. Le second, sur tube sec, utilisé pour la recherche d'anticorps, est le plus répandu (34).

Les ponctions sanguines sur tube sec sont obligatoirement doublées car l'évolution du taux d'anticorps sur une période de 10 à 20 jours demeure le seul phénomène exploitable. On parle de cinétique d'anticorps. La prise de sang initiale doit être la plus précoce possible car certaines séroconversions peuvent être assez précoces (en particulier pour le VRSB, le BHV1 et le PI3). La seconde est réalisée trois semaines plus tard sur les mêmes bovins. Il est indispensable de prélever au moins 5 bovins du lot atteint. Un échantillonnage plus large incluant des animaux atteints et apparemment sains peut donner également des résultats intéressants (67).

1.3.2 . Utilisation du prélèvement

Une fois les prélèvements effectués, il est recommandé de ne pas les placer immédiatement au réfrigérateur, afin de permettre une exsudation optimale du sérum pendant la coagulation. En attendant l'envoi au laboratoire, les tubes doivent être conservés au froid mais ne jamais être congelés, ce qui entraînerait une hémolyse empêchant tout examen diagnostique (34).

Le laboratoire doit traiter l'ensemble des prises de sang le même jour. La mise en évidence indirecte des agents infectieux ne concerne que les virus et *Mycoplasma bovis* (67). La technique majoritairement employée est l'ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay) mais la séroneutralisation et la fixation du complément sont également courantes (54). En général, on réalise un groupage d'analyses. La sérologie peut être réalisée, par exemple, à l'aide d'un Kit ELISA Pentavalent (Centre d'Economie Rurale-DIA, Marloie, Belgique) (VRSB, BHV1, BVDV, PI3, adénovirus 3) (93) ou à l'aide d'un kit Hexavalent (Vetoquinol, Lure, France) permettant d'évaluer la réponse immunitaire humorale de 6 agents de BPIE (BHV1, BVDV, VRSB, PI3, adénovirus3, *Mycoplasma bovis*) (8).

Il est habituel de considérer qu'une multiplication par quatre du titre chez un animal apporte la preuve d'une multiplication virale chez cet animal (30). Toutefois les résultats sont trop tardifs pour être mis à profit dans le cadre de la clinique.

2 . INTERETS ET LIMITES DES DIFFERENTS MODES DE PRELEVEMENT

Cependant, l'emploi des différents examens disponibles doit être étudié en fonction de leur facilité de mise en œuvre, de leur coût, mais aussi de leur intérêt.

2.1 . La facilité de prélèvement

Le prélèvement le plus facilement réalisable est bien entendu la prise de sang. Il ne nécessite qu'une contention minimale, en laissant l'animal au cornadis par exemple. Sa mise en œuvre aisée permet un échantillonnage plus large, incluant, au choix, des bovins malades mais également des bovins apparemment sains. Par contre, la nécessité de répéter les prélèvements à deux semaines d'intervalle minimum oblige à se déplacer deux fois auprès des animaux et à les manipuler deux fois.

L'ENP est également une technique très simple, rapide, qui ne réclame ni technicité particulière ni matériel spécifique. La seule difficulté dans sa réalisation réside dans une bonne contention de l'animal.

De même, l'ATT a l'avantage d'être une technique assez rapide et de ne nécessiter que peu de matériel et peu de main d'œuvre. La standardisation de la méthode offre une réalisation assez aisée en exploitation. Comme pour l'ENP et la ponction sanguine, on intervient sur un animal vigile, ne nécessitant qu'une contention adéquate.

En revanche, la mise en œuvre d'un lavage bronchoalvéolaire est plus complexe et nécessite un appareillage fragile dont ne disposent pas la plupart des praticiens. Un des principaux inconvénients techniques, au cours de l'opération, réside dans l'indispensable stérilisation du fibroscope entre deux prélèvements. La stérilisation s'effectue au glutaraldéhyde, entre une phase de lavage et de détergence et une phase de rinçage.

L'intervention délicate sur un animal déficient respiratoire est l'autre inconvénient majeur. Pour limiter la prise de risque quant à la vie du patient, il faut éviter qu'il soit en état d'insuffisance respiratoire marquée et n'injecter qu'un volume de liquide raisonnable (<200 ml) (53). Cependant, grâce au contrôle optique, le choix de la zone de lavage est possible. De plus, on peut profiter du passage de l'endoscope pour observer directement les cavités nasales, le pharynx, le larynx et la trachée jusqu'à la bifurcation trachéo-bronchique et y découvrir des lésions. Une biopsie peut être réalisée et des corps étrangers de petite taille être ôtés (33).

Nous ne reviendrons pas sur la facilité de réalisation d'une ponction sanguine sur un bovin. En ce qui concerne les autres types de prélèvement, il est évident que l'ENP est plus facile à mettre en œuvre que l'ATT et le LBA. Malgré les nombreuses possibilités offertes par le LBA, sa relative complexité d'exécution et la fragilité d'un matériel rare dans les cliniques rurales rendent cette technique peu adaptée à la pratique courante. L'ATT est une méthode intermédiaire, souple, inoffensive et utilisable en série, permettant d'obtenir des prélèvements de qualité.

2.2 . Le coût

Avant d'aborder le coût des analyses, il convient d'étudier le coût du matériel nécessaire à ces examens. En ce qui concerne l'ENP et la prise de sang, le prix de revient est quasi nul. Le prix de l'ATT est dû au coût du cathéter et du liquide physiologique, soit un prix de revient d'environ 40 euros. Par contre, la réalisation d'un lavage bronchoalvéolaire nécessite un endoscope, matériel coûteux et fragile. Il s'agit d'un élément important à prendre en compte lors du choix de tel ou tel prélèvement .

Revenons au coût engendré par les analyses microbiologiques. Les méthodes diagnostiques des praticiens évoluent et sollicitent de plus en plus les compétences des laboratoires. Ces derniers sont donc entrés ces dernières années dans une logique de moindre coût. Mais, afin d'abaisser encore les frais d'analyses, il est possible de demander au laboratoire de mélanger de 2 à 5 prélèvements d'un même lot et de réaliser les analyses sur ce mélange , dans le cadre d'une pathologie de groupe. Enfin, la précision des commémoratifs

Tableau 4 : Coûts relatifs des analyses de laboratoires en unités de coût (54)

(BHV1 : bovine herpes virus de type 1 ; PI3 : virus parainfluenza de type 3 ; VRSB : virus respiratoire syncytial bovin ; BVDV : Bovine Viral Diarrhoea Virus ; ELISA : Enzym Linked Immuno Sorbent Assay ; SN : séroneutralisation ; IF : immunofluorescence)

FAMILLE	GERME	TECHNIQUE	COÛT
Sérologie	BHV1	ELISA	1.0
		SN	2.0
	PI3	ELISA	1.1
	VRSB	ELISA	1.1
	BVDV	ELISA	1.1
	adénovirus	ELISA	1.7
Antigène	BHV1	IF	3.6
	PI3	IF	3.6
	VRSB	ELISA	3.4
		IF	3.6
	BVDV	ELISA	2.6
		IF	3.3
adénovirus	IF	3.6	
Culture cellulaire	BHV1		5.0
	PI3		5.0
	VRSB		5.0
	BVDV		5.0
	adénovirus		5.0
Bactériologie	DIVERS		3.5
	MYCOPLASME		3.5

permettra de limiter les champs d'investigation ainsi que le coût de revient d'un diagnostic de laboratoire.

Le tableau 4 donne une idée des coûts comparés des différentes méthodes d'analyses (tableau 4). Selon une notation de 1 à 5, les sérologies sont moins chères que la recherche d'antigènes, elle-même moins chère que la culture cellulaire. La bactériologie se situe à un niveau intermédiaire (54).

A titre indicatif, la recherche virologique des cinq virus respiratoires principaux (BHV1, VRSB, BVDV, PI3 et adénovirus) a un coût d'environ 75 euros dans les LVD. Le tarif de la bactériologie est fonction du nombre de germes à identifier soit environ 15 euros par germes. L'identification de mycoplasmes, sous-traitée à l'AFSSA de Lyon, coûte à peu près 25 euros. Enfin, l'antibiogramme se situe un peu en-dessous de 11 euros.

2.3 . Les techniques de laboratoire

La valeur diagnostique des techniques de laboratoire conditionne pour chaque agent infectieux la nature des prélèvements. Ainsi, les techniques sérologiques actuelles sont-elles sans valeur pratique pour le diagnostic des infections bactériennes, à l'exception de *Mycoplasma bovis*. Elles ne permettent donc pas non plus de réaliser d'antibiogramme. L'autre difficulté inhérente à l'exploitation des examens sérologiques réside dans l'impossibilité de distinguer les anticorps élaborés au cours ou à la suite d'une pathologie et ceux induits par la vaccination ou l'immunisation maternelle et/ou colostrale (37).

Comme la prise de sang, l'ENP est plus intéressant pour la virologie que pour la bactériologie. Aussi Fortier avance que les virus tels que VRSB, BHV1, PI3 sont assez faciles à mettre en évidence à partir d'un ENP en réalisant les prélèvements au tout premier stade de la maladie lorsque le jetage est encore séro-muqueux (37).

En revanche le LBA comme l'ATT permettent toute la gamme d'analyses microbiologiques. Les échantillons obtenus par l'une ou l'autre méthode auraient une valeur diagnostique proche ; cependant ceux obtenus par lavage bronchoalvéolaire seraient de meilleure qualité et se prêtent mieux à l'analyse cytologique, permettant le diagnostic des

affections pulmonaires interstitielles lorsque les lésions siègent essentiellement dans les alvéoles (82).

2.4 . Intérêts et limites biologiques

2.4.1 . La pathogénie des germes infectieux

La pathogénie des germes infectieux nous donne des indications sur les parties du tractus respiratoire où l'on a le plus de chance de recueillir des germes lors du prélèvement. Ainsi, pour certains virus comme celui de la rhinotrachéite infectieuse bovine, se multipliant intensément dans les cellules épithéliales de la muqueuse du tractus respiratoire antérieur, la réalisation d'écouvillons des cavités nasales peut alors être intéressante pour la mise en évidence de la présence de tels virus, à condition que la quantité de sécrétions soit suffisante (33). Aussi Viso et Espinasse affirment que le BHV1 est plus facilement isolé à partir de l'ENP que de l'ATT (109).

2.4.2 . La présence de flore commensale

La flore commensale qui peuple les cavités nasales est fort importante. Il est, par exemple, très fréquent d'isoler des pasteurelles ou *Arcanobacterium pyogenes* lors d'ENP chez les bovins sains (37). Aussi, la flore bactérienne obtenue lors d'ENP ne représente-t-elle pas forcément la flore colonisant l'appareil respiratoire profond. De même, l'antibiosensibilité des bactéries isolées de cette manière pourrait ne pas représenter la sensibilité des bactéries à l'origine des troubles pulmonaires. L'efficacité d'un traitement mis en place à partir de ces données est alors parfois décevante. C'est ainsi qu'à l'échelon individuel, les isollements bactériens obtenus par ENP concordent peu avec ceux obtenus par LBA sur des broutards atteints de troubles respiratoires (3).

Au contraire, le LBA et l'ATT en shuntant les voies respiratoires supérieures, permettent, au début d'un épisode respiratoire, d'isoler les bactéries potentiellement pathogènes puis de les identifier et, surtout de tester leur antibiosensibilité (90 ; 97).

2.4.3 . *Les anticorps maternels et vaccinaux*

La grande difficulté inhérente aux examens sanguins réside dans le fait qu'il est généralement impossible de distinguer les anticorps élaborés par une réaction immunitaire et ceux induits par la vaccination ou l'immunisation colostrale.

En effet, chez les veaux de moins de trois mois, la présence d'anticorps passifs d'origine colostrale est fréquente compte tenu de l'exposition des mères aux différents virus respiratoires. Dans le cas du VRSB, ces anticorps maternels s'opposent à l'augmentation des titres en anticorps spécifiques pour toutes les classes d'immunoglobulines - bien que les IgM soient les moins touchées - sans pour autant gêner l'apparition des signes cliniques. Les tests ELISA conventionnels, détectant les IgG, sont alors souvent décevants en ce qui concerne cette classe d'âge. Le dépistage sérologique de choix sera plutôt la détection des IgM spécifiques du VRSB dans le sérum (90 ; 94).

Concernant la vaccination, seul le BHV1 fait exception puisque une nouvelle génération de vaccins « marqueurs » permet aujourd'hui de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés.

A l'issue de cette étude, nous pouvons plus aisément déterminer dans quelles circonstances l'aspiration transtrachéale peut permettre au praticien de faire le tri parmi les différentes hypothèses diagnostiques qui s'imposent à lui dans le cadre d'une pathologie respiratoire.

3 . DISCUSSION

Dans un premier temps, il convient de préciser les raisons qui peuvent encourager le vétérinaire à réaliser une aspiration transtrachéale plutôt qu'une prise de sang, un écouvillonnage nasopharyngé profond ou encore un lavage bronchoalvéolaire.

3.1 . **Quel prélèvement choisir ?**

Envisageons d'abord les examens sérologiques. Ils présentent de trop lourds inconvénients pour être utilisés en routine lors de pathologie respiratoire. La première contre-

indication est qu'ils ne répondent pas à un besoin d'analyses microbiologiques étendues puisqu'ils sont limités aux virus respiratoires et à *Mycoplasma bovis*. Nous avons vu également, chez les jeunes veaux, qu'il est impossible de distinguer les anticorps d'origine maternelle de ceux produits par la réaction immunitaire propre du veau. De même, il est impossible de distinguer les anticorps vaccinaux et les anticorps consécutifs à l'infection naturelle, sauf pour certains vaccins récents contre l'IBR. D'un point de vue pratique, la nécessité de réaliser une cinétique d'anticorps sur deux à trois semaines pose deux problèmes importants. Le premier concerne le diagnostic qui ne peut être que tardif et rétrospectif or, lors de pathologie respiratoire, il faut agir souvent dans une urgence relative. Le second découle du premier et concerne la gestion du client. Il est, en effet, très difficile de lui faire admettre le temps à patienter avant d'avoir une réponse fiable et interprétable du laboratoire alors qu'il attend de son vétérinaire une parade rapide et efficace à son problème. Cependant, la sérologie présente quand même quelques avantages. La facilité de réalisation et de contention du bovin en font un examen de choix pour le praticien qui n'hésitera pas à le mettre en œuvre et à multiplier les prélèvements. Le faible coût engendré incite, lui, les éleveurs à demander assez facilement cet acte. Mais ce faible coût n'est qu'apparent car la sérologie doit être complétée par d'autres examens pour un diagnostic de certitude.

Pour toutes les raisons décrites ci-dessus, les examens sérologiques ne sont pas adaptés à la gestion d'une pathologie respiratoire dans un élevage, qui se présente souvent sous la forme d'épidémie. En revanche, les prises de sang sont l'examen de choix lors d'enquêtes épidémiologiques et/ou à but prophylactique. Ainsi, la recherche des anticorps spécifiques du BHV1 s'est développée dans le cadre des contrôles réguliers réalisés lors de transactions commerciales ou de programmes sanitaires sur la base de contrôles sérologiques. Dans ce cas, l'objectif étant de mettre en évidence le contact de l'animal avec le virus, une seule prise de sang est nécessaire. L'examen sera répété périodiquement et permet de détecter les animaux infectés de façon latente, en état d'anergie, à la faveur d'une réactivation virale. On peut évoquer également le dépistage d'animaux infectés persistants immunotolérants (IPI) au BVDV pour lequel la recherche d'une virémie ne nécessite qu'une prise de sang. Le bilan sérologique peut s'avérer alors utile pour évaluer le statut immunitaire des animaux ou pour tenter de mettre en évidence une circulation virale au sein du groupe (37).

L'écouvillonnage nasopharyngé est également un prélèvement très facile à réaliser, avec une contention aisée. C'est son principal avantage par rapport à l'ATT. Il n'y a aucun intérêt à pratiquer ce prélèvement dans le but de réaliser des analyses bactériologiques, pour les raisons évoquées plus avant, mais il reste suffisant pour l'isolement de certains virus comme le VRSB ou le BHV1. L'ENP peut même s'avérer être un bon choix dans la recherche du VRSB en l'associant au test Speed ReSpiVB (BVT, Seyne-sur-Mer, France), à condition d'agir rapidement dès les premiers symptômes avant que les titres ne s'effondrent (110).

Grâce au lavage bronchoalvéolaire, la plupart des inconvénients que présentent les deux méthodes précédentes sont gommés. Il permet en effet d'établir un diagnostic fiable, complet et précis, grâce à un échantillon prélevé sur un animal vivant. Le LBA serait donc la technique de choix dans la mesure où elle permet de prélever de grandes quantités de liquide au cœur même du foyer infectieux, même si une contention impeccable voire une anesthésie sont nécessaires. Le coût et la fragilité du matériel mettent malheureusement cet examen hors de portée du praticien dans son exercice quotidien sur le terrain. En effet, nous avons vu précédemment toutes les possibilités offertes par l'utilisation du fibroscope mais, si le but recherché est uniquement de mettre en évidence l'agent infectieux d'une pathologie respiratoire, la mise en œuvre de cet examen sera trop lourde et trop coûteuse. On préférera alors réaliser une aspiration transtrachéale dont les résultats d'analyses microbiologiques sont équivalents (82). Le LBA est pour l'instant encore cantonné à la recherche ou au milieu hospitalier.

Lorsqu'un vétérinaire est confronté à un épisode de maladie respiratoire et qu'il estime important, sinon indispensable, d'avoir recours à des examens complémentaires, dans le but d'établir un diagnostic étiologique, le choix du prélèvement repose sur des aspects pratiques et économiques. L'aspiration transtrachéale représente alors une technique simple, reproductible en toute innocuité pour l'animal, de coût réduit, sensible et spécifique, peu gourmande en temps opératoire. Elle permet un bon compromis entre méthodes invasives et superficielles représentées par le LBA et l'ENP, en assurant un accès aux zones profondes de l'appareil respiratoire sur l'animal vivant, et ce sans contamination dans les voies supérieures. De plus, le traitement d'un échantillon d'ATT a l'avantage, par rapport à celui d'un échantillon d'ENP, de fournir des résultats d'analyses bactériologiques fiables. En effet, par

cette technique on ne s'intéresse qu'aux agents infectieux présents dans l'appareil respiratoire profond en évitant les contaminations par les germes présents dans les cavités nasales. Une de ses seules limites est la rapidité avec laquelle doit être traité le prélèvement. Il est indispensable de l'acheminer dans les heures qui suivent au laboratoire afin d'obtenir les résultats les plus justes.

Le but de l'ATT est, nous l'avons vu, de préciser le diagnostic étiologique d'une affection respiratoire mais il faut l'utiliser judicieusement. Effectivement, elle correspond à une approche collective de la pathologie et reste peu intéressante pour un cas isolé. En général, les résultats obtenus apportent une solution pour l'animal prélevé, mais également pour ses congénères, sous forme de traitement thérapeutique ou prophylactique. On doit, bien sûr, modérer ces propos en évoquant l'utilisation de l'ATT dans la recherche. Dans ces circonstances, l'individu prime souvent sur le groupe.

Cependant, dans la pratique quotidienne, le vétérinaire sera seul décideur de la marche à suivre et il lui sera toujours possible de réaliser, en premier lieu, un ENP s'il soupçonne une affection d'origine virale, tout en gardant à l'esprit que l'ATT serait l'examen de choix pour la réalisation d'examens bactériologiques. Si d'autres symptômes sont associés aux symptômes respiratoires, le praticien pourra également confirmer les résultats de l'ATT par d'autres examens complémentaires. Une recherche bactériologique sur un prélèvement de selles serait alors envisageable dans le cas d'une suspicion de salmonellose, comme une recherche de virémie par PCR dans le cas d'une suspicion de BVDV. Les examens sérologiques, eux, seront réservés aux enquêtes épidémiologiques ou prophylactiques.

De fait, après des débuts timides, l'aspiration transtrachéale est aujourd'hui la technique la plus plébiscitée et son utilisation par les vétérinaires ruraux est en progression. Ses nombreux avantages sont mis en avant : matériel simple et peu onéreux, facilité et rapidité de réalisation, contention sans anesthésie, innocuité de l'intervention, obtention d'un prélèvement permettant virologie et bactériologie (tableau 5).

Nous avons compris que la finalité de l'aspiration transtrachéale est de mettre en évidence un agent infectieux dans les voies respiratoires mais ses applications sont nombreuses et ne se limitent pas à la résolution de cas cliniques

Tableau 5 : Avantages et limites des différentes techniques de prélèvements sur animal vivant dans le cadre d'affection respiratoire

	ASPIRATION TRANSTRACHEALE	ECOUVILLONNAGE NASOPHARYNGE	LAVAGE BRONCHOALVEOLAIRE	SEROLOGIE
AVANTAGES	<p>Technique simple, peu traumatisante</p> <p>Réalisable sur un animal vigile</p> <p>Faible contamination du prélèvement</p> <p>Investigation profonde de l'app. respiratoire et bon révélateur du microbisme pathogène</p> <p>Précision et rapidité du diagnostic virologique (1j pour BRSV et PI3, 5j pour BVDV) et bactériologique (24h identification, 48h Antibiogramme)</p> <p>Interprétation souvent univoque (virus, bactéries, parasites)</p>	<p>Simplicité de réalisation</p> <p>Contention de l'animal limitée</p> <p>Rapidité du diagnostic virologique : 1j pour BRSV et PI3, 5j pour BVDV</p>	<p>Possibilité de procéder au lavage à partir d'une bronche principale et ainsi de prélever un lobe puis l'autre.</p> <p>Visualisation de la muqueuse avec l'endoscope</p> <p>Sensibilité supérieure lors d'affection interstitielle</p>	<p>Réalisation très facile</p> <p>Possibilité de prélever de nombreux animaux</p> <p>Faible coût</p>
LIMITES	<p>Coût du cathéter</p> <p>Pas de possibilité d'orienter les prélèvements</p> <p>Délai de traitement bref après prélèvement</p> <p>Faible sensibilité lors d'affection interstitielle, en particulier tumorale</p>	<p>Contamination du prélèvement par la flore commensale des voies respiratoires supérieures et intérêt limité en bactériologie</p>	<p>Nécessité d'un matériel coûteux</p> <p>Anesthésie souvent obligatoire</p> <p>Contaminations oropharyngées fréquentes</p> <p>Temps opératoire ↗ par la stérilisation du matériel entre 2 prélèvements</p>	<p>Diagnostic difficile dû aux interférences avec les anticorps colostraux ou vaccinaux</p> <p>Diagnostic suite à séroconversion sur 2 à 3 semaines ⇒ diagnostic trop tardif</p> <p>Uniquement réalisable pour virologie et mycoplasmes</p>

3.2 . La place de l'aspiration transtrachéale dans la médecine vétérinaire aujourd'hui

3.2.1 . L'intérêt médical de l'ATT

L'intérêt médical de l'ATT n'est plus à démontrer et les recherches d'agents infectieux dans l'appareil respiratoire sont fondées, en premier lieu sur des arguments d'ordre médical. L'identification du germe en cause permet alors de choisir une thérapeutique adaptée et, dans le cas d'une bactérie, de prescrire le bon antibiotique.

Sur le terrain, lors d'une pathologie respiratoire, la précocité du traitement est l'un des principaux gages de sa réussite. Aussi le vétérinaire met-il en place une thérapeutique de première intention fondée sur sa propre expérience et l'examen clinique. L'aspiration transtrachéale n'est souvent réalisée que dans un second temps pour des questions d'organisation et de coût. En effet, le prix d'une analyse virologique et bactériologique à partir d'une ATT variant de 130 à 170 euros, il convient d'entamer une négociation avec l'éleveur pour lui prouver le bien fondé de cet investissement. Dans un lot malade ou dans un élevage, les prélèvements sont donc souvent réalisés lors du second épisode respiratoire pour raisonner et sécuriser la prescription immédiate et sur le plus long terme. En effet, il est essentiel, surtout en seconde intention, de traiter les animaux en ayant connaissance des agents pathogènes et, éventuellement, de leur antibiogramme et pas seulement selon un raisonnement probabiliste qui a déjà été utilisé lors d'un premier épisode. On diminuera alors le risque de rechute et l'éleveur pourra bénéficier d'une meilleure maîtrise des coûts liés aux traitements et aux pertes, et d'une amélioration conséquente de la productivité.

Suivant le schéma décrit ci-dessus, l'ATT est évidemment surtout mise en pratique en élevage de type industriel pour régler les problèmes de BPIE. Mais ce serait une erreur de sous-estimer son intérêt en élevage traditionnel où la précision d'un diagnostic de pathologie respiratoire est également important afin d'enrayer un début d'épizootie.

Après avoir résolu un problème ponctuel, le vétérinaire et l'éleveur pourront alors réfléchir à une action prophylactique.

3.2.2 . *L'intérêt prophylactique de l'ATT*

Au fil des ans, différents vaccins ont été mis sur le marché du médicament dans le cadre des maladies respiratoires des bovins. Aujourd'hui, les vaccins disponibles concernent les virus respiratoires VRSB, BVDV, BHV1, PI3 mais aussi les pasteurelles (*M.haemolytica*).

La connaissance de l'agent infectieux permet, en effet, la mise en place d'une prophylaxie efficace immédiate pour les animaux non atteints, mais également à plus long terme pour les saisons suivantes. Cette démarche prophylactique raisonnée devient aujourd'hui indispensable à la bonne tenue économique d'une exploitation agricole.

Les résultats d'analyses des prélèvements d'aspiration transtrachéale trouvent dans la prophylaxie un prolongement logique à leur utilisation thérapeutique.

3.2.3 . *L'intérêt de l'ATT dans le contrôle de l'antibiothérapie*

Lors des dernières décennies, les éleveurs ont souvent procédé à une antibiothérapie massive et anarchique, essayant de résoudre les problèmes pathologiques par eux-mêmes sans l'aide de leur vétérinaire. Parallèlement à ce phénomène, les souches bactériennes ont présenté des résistances de plus en plus nombreuses et de plus en plus variées qui sont la cause d'échecs thérapeutiques.

Des réseaux d'épidémiologie se sont alors créés dans différentes régions. Ils centralisent les résultats d'antibiogrammes, réalisés suite à des prélèvements d'ATT, qui alimentent leur banque de données. La synthèse des informations collectées permet alors au vétérinaire praticien d'établir des prescriptions plus justes en première intention car ces informations donnent une image de l'antibiorésistance et de l'incidence étiologique des maladies respiratoires au niveau national mais aussi local. L'exemple nous est donné par une étude menée de 1998 à 2002 dans l'Ouest de la France. L'aspiration transtrachéale permet d'y suivre l'évolution des pathogènes rencontrés en élevage de veaux de boucherie et d'y surveiller, pour les bactéries, l'évolution de leur sensibilité aux antibiotiques (96 ; 97).

3.2.4 . *L'intérêt de l'ATT dans la recherche*

L'ATT est également un examen pratique lors du suivi d'infections expérimentales ou d'études pharmacologiques. En effet, l'industrie pharmaceutique a de plus en plus souvent recours aux ATT pour les études visant à évaluer l'efficacité des antibiotiques à indication pulmonaire, en raison de la fiabilité des résultats qui en découlent, de la simplicité de leur mise en œuvre et de leur rapidité d'exécution, même au sein de grands effectifs.

Jusqu'à la fin des années 90, on faisait principalement appel aux écouvillonnages nasopharyngés pour juger de l'efficacité des molécules face à une bactérie donnée. L'ATT permet aujourd'hui de connaître précisément la composition de la flore bactérienne pulmonaire de chaque animal considéré et de n'inclure dans l'étude que ceux dont la flore pulmonaire correspond au profil bactérien ciblé.

De nouvelles présentations commerciales peuvent ainsi prétendre obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM). Baudet et al (8), par exemple, ont utilisé l'aspiration transtrachéale pour mener une étude dont le but était de préciser l'étiologie de cas de BPIE spontanées affectant de jeunes bovins. Ils ont ainsi pu réaliser des examens bactériologiques sur les prélèvements d'exsudat trachéo-bronchique recueillis. Ils ont également pu évaluer l'efficacité thérapeutique d'une spécialité longue action à base d'oxytétracycline.

3.2.5 . *L'intérêt de l'ATT en santé publique*

L'étude des résistances des souches bactériennes, envisagée un peu plus haut, sert également de veille sanitaire quant aux germes rencontrés en médecine humaine dont les résistances sont aussi en augmentation. Ainsi, en témoignant de l'évolution des germes pathogènes, elle devient une sentinelle face à l'arrivée de nouvelles formes de résistance.

Plus ponctuellement, il est important d'informer rapidement l'éleveur des dangers liés à la santé publique lors de l'isolement d'un germe à fort potentiel zoonotique, comme *Salmonella typhimurium* ou *dublin* par exemple.

3.2.6 . *L'intérêt intellectuel de l'ATT*

Il ne faut pas négliger, en dernier lieu, l'aspect psychologique et le confort intellectuel du praticien. Il est toujours agréable de mener un cas clinique jusqu'à son terme et ainsi d'asseoir une certaine autorité scientifique vis-à-vis de l'éleveur même si l'identification du ou des germes en cause n'apporte rien à l'issue du problème. Ainsi, l'isolement d'*Histophilus somni*, par exemple, n'a-t-il actuellement qu'un intérêt cognitif et non appliqué puisqu'aucun vaccin n'est commercialisé en France et que ce germe est largement antibiosensible.

CONCLUSION

Le travail des praticiens ruraux est en mutation à travers une nouvelle approche de l'élevage, proposant plus de prévention et de suivi que d'actes curatifs. La manière d'établir un diagnostic évolue aussi avec l'avènement d'examen complémentaires aux résultats fiables, réalisables en exploitation. Dans ce travail, nous avons essayé d'appliquer cette réflexion aux maladies respiratoires des bovins. En effet, la complexité des affections respiratoires et la multiplicité des agents pathogènes, qui en sont les causes, doivent inciter les vétérinaires à abandonner leur attitude empirique, fondée sur l'observation de quelques indices cliniques et sur la mise en place d'une antibiothérapie à l'aveugle en première intention, et à prendre conscience qu'un diagnostic s'appuie sur un ensemble d'éléments épidémiologiques, cliniques, éventuellement lésionnels, et de laboratoire.

Cette étude montre que l'aspiration transtrachéale est désormais l'outil de choix au service du praticien dans la lutte contre les pathologies respiratoires chez les bovins. Les différentes techniques, qui n'ont cessé de s'améliorer ont débouché sur des protocoles simples, faciles à mettre en œuvre, reproductibles et ne nécessitant qu'un matériel peu onéreux, permettant d'obtenir des prélèvements de qualité sur l'animal vivant. L'ATT permet de prélever de grandes quantités de liquide au site même de l'infection et de pratiquer des recherches virologiques, bactériologiques, parasitologiques et cytologiques conduisant le praticien à un diagnostic étiologique. Des programmes thérapeutiques et prophylactiques pertinents peuvent alors être mis en place.

Nous avons montré également que le rôle de l'aspiration transtrachéale, grâce aux résultats qu'elle fournit, va bien au-delà de l'action ponctuelle en élevage. Les résultats des antibiogrammes obtenus participent à l'élaboration de réseaux d'antibiosurveillance locaux et nationaux. Ces informations seront utilisées en retour sur le terrain, mais serviront aussi de sentinelle quant à l'apparition de nouvelles formes de résistances bactériennes, qui s'étendraient inévitablement en médecine humaine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 . ABU-AMERO KK, HALABLAB MA, MILES RJ. Nisin resistance distinguishes *Mycoplasma spp.* From *Acoleplasma spp.* And provides a basis for selective growth media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 3107-3111.
- 2 . ADLAM C, THOMAS E. Epidémiologie et pathogénie des infections respiratoires bovines dues aux pasteurelles et à *Haemophilus somnus*. In : *Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B.,1997, 136-150.
- 3 . ALLEN JW, VIEL L, BATEMAN KG, ROSENDAL S, SHEWENP E, PHYSICK-SHEARD P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves. Association between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can. J. Vet. Res.*, 1991, **55**, 341-346.
- 4 . AMES TR. The epidemiology of BRSV infection. *Vet. Med.*,1993, **88**(9), 881-885.
- 5 . BAKER JC, WERDIN RE, AMES TR, MARKHAM RJ, LARSON VL. Study of the etiologic role of bovine respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves. *J.A.V.M.A.*, 1986, **189**, 66-70.
- 6 . BARONE R. *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3, Splanchnologie, Fascicule 1, appareils digestif et respiratoire.* Paris :Vigot,1976, 879 p.
- 7 . BASKERVILLE A. Diagnostic methods in infectious respiratory diseases. *New Zeal. Vet. J.*, 1981, **29**, 239-241.
- 8 . BAUDET HM, CHIEZE C, ESPINASSE J. Un exemple de suivi clinique et microbiologique dans les maladies respiratoires des jeunes bovins. *Rec. Méd. Vét.*, 1994,**170**(4/5), 209-216.
- 9 . BELANGER F, ALAIN R, PAYMENT P, LECOMTE J, TRUDEL M. Rapid titration of bovine, caprine and human RS virus by a monoclonal antibody and a permissive ovine kidney cell line. *J. Virol. Methods*, 1988, **20**, 101-107.
- 10 . BOSGIRAUD C, NICOLAS JA. Pneumonie à coronavirus chez les bovins. A propos de deux observations. *Rec. Méd. Vét.*, 1986, **162**, 1085-1086.
- 11 . BRUGERE-PICOUX J, PERRIN B, FEDIDA M. Le virus respiratoire syncytial bovin. Aspects cliniques et épidémiologiques en France. *Rec. Méd. Vét.*, 1985, **161**(12), 1075-1085.

- 12 . BRYSON DG, MACNULTY MS, LOGAN EF, CUSH PF. Respiratory syncytial pneumonia in young calves. Clinical and pathological findings. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 1648-1655.
- 13 . BUSSIERAS J, CHERMETTE R. *Abrégé de parasitologie vétérinaire. Fascicule 3. Helminthologie*. Douai : Rosset,1988, 267p.
- 14 . CABANIE P, SCHELCHER F. Aspects lésionnels des principales maladies respiratoires des bovins. *In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Vichy, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V., 1997, 59-63.
- 15 . CADORE JL. Apport de la cytologie du liquide de lavage bronchoalvéolaire. *Point Vét.*, 1994, **26**(numéro spécial), 528-530.
- 16 . CALDOW G. Bronchoalveolar lavage in the investigation of bovine respiratory disease. *In Practice*, 2001, **23**, 41-43.
- 17 . CALDOW G, EDWARDS S, NIXON P, PETER AR. Associations between viral infection and respiratory disease in young beef bulls. *Vet., Rec.*, 1988, **122**, 529-531.
- 18 . CAMUSET P, MAGE C. La dictyocaulose bovine : ça existe toujours !. *In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Vichy, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V., 1997, 347-353.
- 19 . CHATELAIN E. Anatomie de l'appareil respiratoire des bovins. *Rec. Méd. Vét.*, 1985, **161**, 995-1007.
- 20 . CITTI C, MARENDA M, ROSENGARTEN R. *Mycoplasma bovis* : facteurs impliqués dans les interactions avec l'hôte. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 23-24 Novembre 2004. Toulouse : S.F.B.,2004, 130-134.
- 21 . COLLINS JK, JENSEN R, SMITH GH, FLACK DE, KERSCHEN R, BENNETT BW *et al.* Association of bovine respiratory syncytial virus with a typical interstitial pneumonia in feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 1045-1049.
- 22 . CREIGHTON SR, WILKINS RJ. Transtracheal aspiration biopsy : technique and cytologic evaluation. *J. A .A .H.A.*, 1974, **10**, 219-226.
- 23 . DANNARCHER G, PERRIN M, MOUSSA A, FEDIDA M. La rhinotrachéite bovine infectieuse. *Rec. Méd. Vét.*, 1985, **161**(12), 1069-1074.
- 24 . DEWEY KJ, LITTLE PB. Environmental survival of *Haemophilus somnus* and influence of secretions and excretions. *Can. J. Comp. Med.*, 1984, **48**, 23-26.
- 25 . DISTRIVET. Aspiration transtrachéale. Guide pratique. Romainville : Distrivet SA, 8p.

- 26 . DORCHIES P. Parasitoses respiratoires des bovins : actualités. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B., 1997, 219-228.
- 27 . DOUART A. Agents bactériens impliqués dans les BPI des bovins. *Point Vét.*, 2002, **231** , 26-30.
- 28 . DOUART A, SIMON A. Diagnostic et contrôle de l'infection par le BVDV. *Point Vét.*, 1997, **28** (187), 1985-1993.
- 29 . DOUART A, LEMARCHAND F, ASSIE S. L'aspiration trans-trachéale chez les bovins (A.T.T.). *Bull. G.T.V.*, 2001, **12**, 13-16.
- 30 . DUBOVI EJ. Diagnosing BRSV infection : a laboratory perspective. *Vet. Med.*, 1993, **88**, 888-893.
- 31 . ESPINASSE J, VISO M. Broncho-pneumonies infectieuses enzootiques des jeunes bovins (B.P.I.E.). *Bull. G.T.V.*, 1983, **3**, 59-72.
- 32 . ESPINASSE J, LEVRIER B, ALZIEU JP, PAPAGEORGIOU C, BEGUIN JC, VAN GOOL F. Bronchopneumonies infectieuses enzootiques des veaux d'élevage. Rôle des pasteurelles et de *Mycoplasma bovis* dans la maladie naturelle. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B., 1988, 94-99.
- 33 . FALCY C, MILLEMANN Y, MAILLARD R, POLACK B. Examens paracliniques en pathologie respiratoire. *Point Vet.*, 2003, **34**(numéro spécial), 142-147.
- 34 . FEDIDA M, DANNACHER G, PERRIN M, MARTEL JL, MOUSSA A, PERRIN B. Diagnostic de laboratoire des affections respiratoires des bovins (1). *Rec. Méd. Vét.*, 1985, **161**, 1191-1202.
- 35 . FEDIDA M, PERRIN M, MOUSSA A, COUDERT M, PERRIN B, DANNACHER G. Les virus associés aux maladies respiratoires des bovins. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B., 1988, 47-57.
- 36 . FORMAN AJ, BABUIK A, BALDWIN F, FRIEND SC. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection of calves on cell populations recovered by lung lavage. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 1174-1179.
- 37 . FORTIER G. Pathologies respiratoires : Quel rôle pour le laboratoire ?. *In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Vichy, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V., 1997, 67-72.

- 38 . GROOMS D, WALTZ P. Epidémiologie et pouvoir pathogène du virus BVD dans les affections respiratoires bovines. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B.,1997, 119-127.
- 39 . GUICHON PT, JIM GK, BOOKER CW, SCHUNICHT OC. *Haemophilus somnus* : un pathogène important dans les feedlots. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B.,1997, 166-176.
- 40 . HANNAN PCT. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *mycoplasma species*. *Vet. Res.*, 2000, **31**, 373-395.
- 41 . HARRIS FW, JANZEN ED. The *Haemophilus somnus* disease complex (hemophilosis) : A review. *Can. Vet. J.*, 1989, **30**, 816-822.
- 42 . HOWARD CJ, GOURLAY RN, THOMAS LH, STOTT EJ. Induction of pneumonia in gnotobiotic calves following inoculation of *Mycoplasma dispar* and *ureaplasmas* (T-mycoplasmas). *Res. Vet. Sci.*, 1976, **21**, 227-231.
- 43 . JACOBS JW, EDINGTON N. Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus. *Res. Vet. Sci.*, 1975, **18**, 299-306.
- 44 . KAASHOEK MJ, VAN OIRSCHOT JT. Early immunity induced by a live gE negative bovine herpes virus 1 marker vaccine. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 191-197.
- 45 . KHARS RF. Infectious Bovine Rhinotracheitis : a review and update. *J.AV.M.A.*, 1977, **171**(10), 1055-1064.
- 46 . KIORPES AL, BUTLER DG, DUBIELZIGR R, BECK KA. Les pneumonies enzootiques des veaux : aspects cliniques et morphologiques. *Point Vét.*, 1989, **124**, 719-730.
- 47 . LANGE E. *Le recours au laboratoire dans le cadre de la pathologie respiratoire des bovins : exemples du BRSV et du BHV1*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 1995, n°52, 109p.
- 48 . LE GRAND D, POUMARAT F, BEZILLE P. Mycoplasmoses bovines à *Mycoplasma bovis* . *Point Vét.*, 1996, **28**(180), 771-778.
- 49 . LE GRAND D, ARCANGIOLI MA, POUMARAT F, BEZILLE P. *Epidémiologie et thérapeutique des infections à Mycoplasma bovis : une synthèse*. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 23-24 Novembre 2004. Toulouse : S.F.B.,2004, 140-145.
- 50 . LE GRAND D, ARCANGIOLI MA, GIRAUD N, POUMARAT F, BEZILLE P. Pneumopathies à mycoplasmes chez les bovins. *Point Vét.*, 2004, **249**, 40-42.

- 51 . MCLAUGHLIN RW, MISKE FR. A Technique for bronchial aspiration in the calf. *Bovine Practice*, 1980, **6**, 29-31.
- 52 . MCNULTY MS, BRYSON DG, ALLAN GM, LOGAN EF. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Vet. Microbiol.*, 1984, **9**, 425-434.
- 53 . MAILLARD R, DOUART A. Examens complémentaires possibles en pathologie respiratoire bovine. In : *Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Nantes, Mai 2003. Paris : S.N.G.T.V., 2003, 91-94.
- 54 . MANET B. Bilan des analyses effectuées. In : *Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Vichy, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V., 1997, 49-52.
- 55 . MARTEL JL. Forme respiratoire des salmonelloses bovines. *Rec. Méd. Vét.*, 1985, **161**, 1153-1156.
- 56 . MARTEL JL. Salmonelloses respiratoires des bovins. In : *Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B., 1997, 185-188.
- 57 . MARTEL JL, MICHEL R. Le rôle des pasteurelles dans les bronchopneumonies infectieuses des bovins. *Rec. Méd. Vét.*, 1985, **161**, 1123-1131.
- 58 . MARTEL JL, MICHEL R. Le diagnostic bactériologique des bronchopneumonies infectieuses des bovins : problèmes particuliers des *Pasteurellaceae*. *Bull. Lab. Vét.*, 1986, **23**, 1-8.
- 59 . MARTEL JL, POUMARAT F. Les bactéries et les mycoplasmes associés aux maladies respiratoires des jeunes bovins en France. In : *Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B., 1988, 58-66.
- 60 . MARTEL JL, COUDERT M. Bacterial resistance monitoring in animals : the French national experiences of surveillance schemes. *Vet. Microbiol.*, 1993, **35**, 321-338.
- 61 . MARTEL JL, CHASLUS-DANCLA E, COUDERT M, LAFONT JP. La résistance aux antimicrobiens. Pourquoi et comment savoir ? Comment prévoir ? In : *Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 14-15 Décembre 1994. Toulouse : S.F.B., 1994, 76-85.
- 62 . MATTSON DE. Adenovirus infections in cattle. *J.A.V.M.A.*, 1973, **163**, 894-896.
- 63 . MATTSON DE, NORMAN BB, DUNBAR JR. Bovine Adenovirus type 3 infection in feedlot calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 67-72.
- 64 . MENARD MF. Les moyens de diagnostic de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) au laboratoire. In : *Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Vichy, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V., 1997, 291-297..

- 65 . MOUSSA A, ESPINASSE J. Diagnostic virologique rapide : recherche des virus par cultures cellulaires avec détection par immunofluorescence. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B.,1988, 128-132.
- 66 . NAVETAT H. A propos...L'aspiration transtrachéale chez les bovins. *Point Vét.*, 1995, **166**, 90.
- 67 . NAVETAT H, VALARCHER JF, SCHELCHER F. Maladies respiratoires bovines : le bon prélèvement sur l'animal vivant. *In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Vichy, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V., 1997, 77-80.
- 68 . OTTER A, FARRER ME. Pneumonia associated with five respiratory pathogens in a group of steers. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 187-188.
- 69 . PASTORET PP , AGUILAR-SETIEN A, SCHOENAERS F. Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovin Herpesvirus 1). *Ann. Méd. Vét.*, 1978, **122**, 371-391.
- 70 . PASTORET PP, THIRY E, DUBUISSON J, BUBLLOT M. La rhinotrachéite infectieuse bovine : pathogénie, épidémiologie et prophylaxie. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B.,1988, 67-74.
- 71 . PASTORET PP, THIRY E, SAVEY M. L'infection par le virus respiratoire syncytial bovin. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B.,1988, 75-82.
- 72 . PASTORET P, HAMERS C, LECOMTE C, LAMBOT M. Biologie et épidémiologie de l'infection par le virus de la diarrhée virale bovine BVD/MD. *Point Vét.*, 1997, **28** (187), 1979-1983.
- 73 . PERREAU P. *Pasteurella, Actinobacillus.* in : LE MINOR L, VERON M. Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1982, 335-345, 773p.
- 74 . POTGIETER LND. Current concepts on the role of viruses in respiratory tract disease of cattle. *Bov. Pract.*, 1977, **10**, 75-81.
- 75 . POTGIETER LND, MAC CRACKEN MD, HOPKINS FM, WALKER RD, GUY JS. Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1984, **45**, 1582-1585.
- 76 . POUMARAT F, MARTEL JL. Mycoplasmoses respiratoires des bovins. *Rec. Méd. Vét.*, 1985, **161**, 1115-1122.
- 77 . POUMARAT F, MARTEL JL. Mycoplasmoses bovines. *Revue Méd. Vét.*, 1987, **138**, 799-806.

- 78 . POUMARAT F, MARTEL JL. L'utilisation des prélèvements d'aspiration transtrachéale pour la mise en évidence des bactéries et des mycoplasmes. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B.,1988, 137-140.
- 79 . POUMARAT F, MARTEL JL. Mise au point et évaluation d'une méthode opacimétrique pour la détermination de l'antibiosensibilité de *Mycoplasma bovis* in vitro. *Ann. Rech. Vét.*,1989, **20**, 135-143.
- 80 . POUMARAT F, PERRIN B, LONGCHAMBON D. Identification of ruminant Mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.*, 1991, **29**, 329-338.
- 81 . POUMARAT F, LE GRAND D, BEZILLE P. Epidémiologie, pouvoir pathogène et diagnostic des affections à *Mycoplasma bovis*. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B.,1997, 189-197.
- 82 . PRINGLE JK. Ancillary testing for the ruminant respiratory system. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 1992, **8**(2), 243-256.
- 83 . REEVE-JOHNSON TL, THOMAS L, STIPKOVITS L, WINDSOR D. Mycoplasmoses respiratoires des bovines en Europe. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B.,1997, 198-207.
- 84 . REMER P. *Intérêt de l'utilisation des lavages broncho-alvéolaires dans le diagnostic des broncho-pneumonies infectieuses enzootiques des bovins à travers les différentes techniques et leur évolution.* Thèse Méd. Vét., Lyon, 1997, n°83, 99p.
- 85 . REYNOLDS DJ, DEBNEY TG, HALL GA, THOMAS LH, PARSONS KR. Studies on the relationships between Coronavirus from the intestinal and respiratory tracts of calves. *Arch. Virol.*, 1985, **85**, 71-83.
- 86 . ROSENGARTEN R, YOGEV D. Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardization. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 149-158.
- 87 . SAMAILLE JP. ATT : le point de vue du microbiologiste. *Action Vét.*, 1995, **1335**, 12-14.
- 88 . SCHELCHER F, ESPINASSE J,SAVEY M, JOUGLAR JY, BEZILLE P. Pathgénie des infections pasteurelliques et prévention vaccinale. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B.,1988, 83-93.

- 89 . SCHELCHER F, VALARCHER JF, DELVERDIER M, CABANIE D, ESPINASSE J. Diagnostic des troubles respiratoires des bovins, bases cliniques et épidémiologiques. *Point Vét.*, 1991, **23** (138),339-345.
- 90 . SCHELCHER F, NAVETAT H, LUET P, BAROUX D, THIESE I, VALARCHER JF *et al.* Examens de laboratoire dans les affections respiratoires et intestinales diarrhéiques des bovins. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1992. Toulouse : S.F.B.,1992, 133-153.
- 91 . SCHELCHER F, VALARCHER JF, NAVETAT H, ESPINASSE J. Aspects cliniques de l'infection des bovins par le virus de la maladie des muqueuses (BVDV). *Bull. G.T.V.*, 1993, **4**, 23-32.
- 92 . SCHELCHER F, VALARCHER JF, FOUCRAS G. Comment savoir si le virus BVD est impliqué dans un élevage. *In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Vichy, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V., 1997, 357-362.
- 93 . SCHREIBER, DESSY F, COLLARD F, KNOTT I, COPPE PH, LETESSON JJ. Lavage bronchoalvéolaire (LBA) par voie nasotrachéale sur bovin non tranquilisé pour la recherche du virus respiratoire syncytial bovin. *Bull. G.T.V.*, 1997, **5**, 17-24.
- 94 . SCHRIJVER RS. Pathogénie des infections dues au virus respiratoire syncytial bovin. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B.,1997, 105-111.
- 95 . SHARMA R, WOLDEHIWE T. Bovine respiratory syncytial virus, a review. *Vet. Bull.*,1991, **61**, 1117-1131.
- 96 . SIX C. Utilisation de l'aspiration trans-trachéale (ATT) lors de suivi terrain d'élevages de veaux. *In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Nantes, Mai 2003. Paris : S.N.G.T.V., 2003, 101-104.
- 97 . SIX C, BONNIER M, CHARNAL M, GUESNON F, LECOZ N, QUEFELEC C *et al.* Bilan de résultats de bactériologie d'antibiosensibilité et de virologie à partir d'aspirations transtrachéales réalisées dans le cadre de suivis terrain lors de pathologie respiratoire chez le veau de boucherie. *Bull. G.T.V.*, 1996, **4**, 57-61.
- 98 . SNOWDON WA. The IBR-IPV virus : reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.*, 1965, **41**, 135-142.

- 99 . STOTT EJ, THOMAS LH, COLLINS AP, CROUCH S, JEBBETT J, SMITH GS *et al.* A survey of virus infections of respiratory tract of cattle and their association with disease. *J. Hyg. Camb.*,1980, **85**, 257-271.
- 100 . THIRY E, DOUART A. Les stratégies vaccinales pour la prévention des pathologies respiratoire du bétail. *In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Clermont-Ferrand, 30-31 Mai – 1^{er} Juin 2001. Paris : S.N.G.T.V., 2001, 145-156.
- 101 . THIRY E, PASTORET PP, DISPAS M, HAMERS C, LAMBOT M, LECOMTE C *et al.* Le rôle de la vaccination dans la prévention des maladies respiratoires d'origine virale chez les bovins. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B.,1997, 278-299.
- 102 . THIRY E, LEMAIRE M, SCHYNTS F, VANDERHEIJDEN N, MEYER G, EISPAS M *et al.* La rhinotrachéite infectieuse bovine : l'infection, ses manifestations. *In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V.* Vichy, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V., 1997, 279-284.
- 103 . THIRY E, LEMAIRE M, SCHYNTS F, MEYER G, DISPAS M, GOGEV S. Les conséquences de l'infection des bovins par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Point Vét.*, 1999, **30**(199), 279-286.
- 104 . TRUMEL C., BOUCRAUT-BARALON C. Interprétation de la cytologie du lavage bronchoalvéolaire. *Nouv. Prat. Vét.*, 2001, **3**, 213-214.
- 105 . ULMER P. *Les bronchopneumonies infectieuses enzootiques des jeunes bovins : lavage bronchique, bactériologie et antibiogramme.* Thèse Méd. Vét., Alfort, 1984, n°113,97p.
- 106 . URQUHART GM, MULLIGAN W, JARRET WFH. La bronchite vermineuse des bovins. *Point vét.*, 1985, 17(90), 287-295.
- 107 . VAN DER POEL WHM, ELVANDER M. Epidémiologie des infections dues au virus respiratoire syncytial bovin : conséquences sur les différents types de productions bovines. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 26-27 Novembre 1997. Toulouse : S.F.B.,1997, 88-96.
- 108 . VILCEK S, NETTLETON PF, HERRING JA, HERRING AJ. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 1994, **42**, 53-64.
- 109 . VISO M, ESPINASSE J. Utilisation de l'aspiration transtrachéale pour l'étude des affections respiratoires des ruminants. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B.,1988, 133-136.

- 110 . VISO M, ESPINASSE J, LAVAL A. L'aspiration transtrachéale chez les bovins. Technique et traitement des échantillons prélevés au laboratoire. *Rec. Méd. Vét.*, 1983, **159**,1059-1064.
- 111 . WAXVEILER S, KARELLE-BUITHI L, SNEYERS M, LAMBERT AF, DELCHAMBRE M, DUBUISSON J *et al.* Circulation de souche non cytopathogène du virus BVD/MD dans des lots de taurillons. *In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B.* Paris, 24-25 Novembre 1988. Toulouse : S.F.B.,1988, 42-46.
- 112 . WELLMANS G, VAN OPDENBOSCH E, OUDGWATER J, PATTIN R. Intervention du virus Corona dans un cas de pneumonie chez les bovins. *Ann. Méd. Vet.*, 1985, **129**, 585-587.
- 113 . WELLMANS G, VAN OPDENBOSCH E, OUDGWATER J. Isolement d'un virus BHV1 (Bovine herpesvirus 1), dans le sperme de deux taureaux. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 119-120.
- 114 . WESTENBRINK F, BRINKOF JMA, STRAVER PL, QUAKE J, DE LEEUW PW. Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralisation tests for serology of bovine respiratory syncytial virus infections. *Res. Vet. Science*, 1985, **38**, 334-340.
- 115 . ZIMMER GM, STRAVER PJ, DE LEEUW PW. Diagnostic of bovine respiratory syncytial virus infections by virus detection in lung lavage samples. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 143-147.
- 116 . ZUNDEL E, LAMBLIN J, GOUFFE D, DALOU F. Prélèvements trachéobronchiques chez les bovins par lavage et aspiration transtrachéale à la seringue. Application au diagnostic bactériologique des maladies respiratoires. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*, 1985, **69**, 321-330.

