

Université de Montréal

**Évaluation, surveillance et soutien de la fonction
respiratoire chez des veaux clonés en période
néonatale**

par

Anne-Claire BRISVILLE

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Août 2010

© Anne-Claire Brisville, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Évaluation, surveillance et soutien de la fonction respiratoire chez des veaux clonés
en période néonatale

Présenté par
Anne-Claire Brisville

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr André Desrochers, président-rapporteur

Dr Gilles Fecteau, directeur de recherche

Dr Soren Boysen, co-directeur

Dr Lawrence Smith, co-directeur

Dr David Francoz, membre du jury

Résumé

Une morbidité et une mortalité néonatales élevées limitent l'efficacité du clonage somatique chez les bovins. Des malformations myoarthrosquelettiques, des anomalies ombilicales, des problèmes respiratoires et de la faiblesse ont été fréquemment observés chez les veaux clonés nouveaux-nés. Cette étude rétrospective porte sur 31 veaux clonés. Ses objectifs étaient de décrire les problèmes respiratoires rencontrés, leur évolution au cours du temps, les traitements instaurés pour soutenir la fonction respiratoire et la réponse aux traitements. Vingt-deux veaux ont souffert de problèmes respiratoires. La tachypnée, l'hypoxémie et l'hypercapnie sont les signes cliniques les plus fréquemment observés. L'analyse des gaz sanguins a été un outil essentiel dans le diagnostic et le suivi de la fonction respiratoire. La radiographie a permis une évaluation globale du poumon. L'oxygénothérapie intranasale et la ventilation mécanique ont permis de limiter la mortalité due à une insuffisance respiratoire à 18% (4/22). Cette étude a permis d'émettre des hypothèses quant à l'origine des problèmes respiratoires chez les veaux clonés. Plus d'une maladie semblent affecter les veaux clonés. La déficience en surfactant, l'hypertension pulmonaire persistante et le retard de résorption du fluide pulmonaire figurent parmi les entités pathologiques les plus probables.

Mots-clés : veau, clonage, néonatal, problèmes respiratoires, oxygénothérapie, ventilation mécanique, gaz sanguins

Abstract

High morbidity and mortality decrease the efficiency of somatic cell nuclear transfer. The main abnormalities observed in neonatal cloned calves are skeletal malformations, enlarged umbilical vessels, respiratory problems and weakness. This retrospective study involved 31 cloned calves. The objectives of this study were to describe the respiratory problems suffered by cloned calves during neonatal period, to assess their evolution, and to determine the possible causes. Secondary objectives were to describe the techniques used to assess and support respiratory function and the calves' response. Respiratory problems affected 22 calves. Tachypnea, hypoxemia and hypercapnia were the most frequently observed signs. Arterial blood gas analyses and chest radiographs were precious to identify and assess respiratory problems. Intranasal oxygen and mechanical ventilation were efficient to limit mortality due to respiratory failure to 18% (4/22). It is plausible that more than one disease affect cloned calves. Delayed resorption of pulmonary fluid, persistent pulmonary hypertension and surfactant deficiency, or a combination of these factors, are among the most probable pathological entities.

Keywords: calf, cloning, neonatal, respiratory problems, oxygen therapy, mechanical ventilation, blood gas analysis

Table des matières

Chapitre 1 - Revue de la littérature	3
<i>I. Le clonage somatique chez les bovins</i>	3
I-1. Techniques de clonage	3
I-1-1. La section embryonnaire.....	3
I-1-2. Le transfert nucléaire	4
I-1-3. Origine des cellules utilisées.....	5
I-1-3-a. Les embryons	5
I-1-3-b. Les ovocytes	5
I-1-3-c. Les cellules donneuses de noyaux	5
I-2. Les applications du clonage	7
I-3. Efficacité du clonage dans l'espèce bovine	9
I-3-1. Le développement <i>in vitro</i> préimplantatoire.....	9
I-3-2. Le transfert embryonnaire et l'implantation.....	10
I-3-3. Le premier trimestre de gestation (jusqu'à 90 jours de gestation)	11
I-3-4. Les deuxième et troisième trimestres de gestation	12
I-3-5. Le syndrome du gros veau et la période périnatale.....	13
I-3-6. La période post-natale, sevrage et jusqu'à l'âge adulte	14
I-4. Articles publiés sur la prise en charge des veaux clonés à la naissance	15
I-4-1. Garry et al. 1996. ⁶⁷	16
I-4-2. Hill et al. 1999. ⁶⁸	22
I-4-3. Chavatte-Palmer et al. 2002 ⁷¹	27
I-4-4. Panarace et al. 2007 ⁴⁴	31
I-4-5. Batchelder et al. 2007 ^{72,73}	34
<i>II. Les maladies respiratoires en période néonatale chez le veau</i>	40
II-1. La transition du système cardio-respiratoire lors de la naissance.....	41
II-1-1. Organisation du système cardiovasculaire fœtal	41
II-1-2. Transition à la naissance de la circulation fœtale vers la circulation d'adulte	44
II-1-2-a. La séparation du placenta	44
II-1-2-b. La première inspiration.....	45
II-1-2-c. Transition de la circulation fœtale en circulation d'adulte	45

II-1-3. Le fluide pulmonaire.....	47
II-2. Les anomalies respiratoires en période périnatale en médecine humaine et vétérinaire	48
II-2-1. Anoxie du nouveau-né.....	48
II-2-2. Le Syndrome de Détresse Respiratoire du nouveau-né.....	49
II-2-2-a. Le surfactant – étiopathogénie du syndrome de détresse respiratoire	49
II-2-2-b. Les manifestations cliniques et pathologiques	51
II-2-2-c. Diagnostic	53
II-2-2-d. Traitement.....	55
II-2-2-e. Prévention	57
II-2-3. Tachypnée transitoire du nouveau-né.....	58
II-2-4. Pneumonie par aspiration	58
II-2-4-a. L'étiopathogénie	58
II-2-4-b. Les signes cliniques.....	59
II-2-4-c. Le traitement et la prévention	60
II-2-5. Hypertension pulmonaire primitive ou persistance de la circulation fœtale	61
II-2-5-a. L'étiopathogénie	61
II-2-5-b. Les signes cliniques.....	61
II-2-5-c. Le diagnostic.....	62
II-2-5-d. Le traitement.....	62
II-2-6. Les complications pulmonaires de maladies systémiques: Acute Lung Injury (ALI) et Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS).....	64
II-2-6-a. La définition et les signes cliniques.....	64
II-2-6-b. La pathophysiologie	65
II-2-6-c. Le diagnostic.....	65
II-2-6-d. Le traitement.....	66
II-3. L'exploration de la fonction respiratoire	67
II-3-1 Rappels anatomiques et physiologiques	67
II-3-1-a. La ventilation	67
II-3-1-b. Les échanges gazeux	67
II-3-2. Paramètres cliniques	69
II-3-2-a. Fréquence respiratoire et qualité de la respiration.....	69
II-3-2-b. Auscultation.....	70
II-3-2-c. Examen des muqueuses – détection de la cyanose	70
II-3-2-d. Les analyses de laboratoires	71
II-3-2-e. Radiographie thoracique.....	83

II-4. Support de la fonction respiratoire	84
II-4-1. Oxygénothérapie.....	84
II-4-1-a. Indications.....	84
II-4-1-b. Objectifs de traitement	87
II-4-1-c. Modalités	90
II-4-2. Assistance respiratoire mécanique.....	91
II-4-2-a. Indications.....	91
II-4-2-b. Objectifs de traitement	92
II-4-2-c. Modalités	93
Chapitre 2 : Article.....	96
<i>Respiratory diseases in neonatal cloned calves.</i>	96
Abstract.....	98
Introduction.....	99
Materials and Methods	100
Statistical analyses	101
Results.....	102
Abnormalities of respiratory function during “Birth Period”	102
Abnormalities of respiratory function during “Neonatal Period”	103
Therapies to support pulmonary function	104
Intranasal oxygen therapy (INO)	104
Mechanical positive pressure ventilation (mechanical PPV).....	106
Outcome	108
Discussion.....	109
Conclusion	113
Chapitre 3 : Discussion	119
<i>I. Problèmes respiratoires et soutien.....</i>	<i>119</i>
I-1. Incidence des problèmes respiratoires et principale cause de mortalité en période néonatale	119
I-2. À propos des maladies respiratoires des veaux clonés.....	120
I-2-1. Syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né.....	120
I-2-2. Tachypnée transitoire du nouveau-né	122
I-2-3. Hypertension pulmonaire persistante.....	124
I-2-4. Apnée	125

I-3. À propos de l'hypoxémie	125
I-3-1. L'oxygénothérapie devrait-elle être systématique	125
I-3-2. À propos de l'interprétation de la PaO ₂ vs effet de l'oxygénothérapie	126
I-3-2. À propos de l'hypoxémie vs l'anorexie	127
<i>II. Observations cliniques non respiratoires intéressantes</i>	128
II-1. Effet lignée	128
II-2. Alimentation d'un veau critique	129
II-3. Structures ombilicales	130
II-4. Anomalies hématologiques	132
II-5. Température	134
II-6. Complications digestives post période néonatale	136
<i>III. Et si c'était à refaire</i>	137
III-1. Logistique	137
III-1-1. Moyens matériels	137
III-1-2. Moyens personnels	138
III-1-3. Les apprentissages retenus	138
III-2. Éthique	138
Conclusion	140
Bibliographie	141
Annexes	xiii
Annexe 1 : Résultats des gaz sanguins veineux obtenus moins de 10 minutes après la naissance, en l'absence de traitement	xiii
Annexe 2 : Répartition des veaux clonés selon leur cohorte de naissance et leur lignée génétique	xiv
1. Lignée génétique (médiane, n=27 veaux nés vivants)	xiv
2. Mortalité néonatale (0-14jours) (n=27 veaux nés vivants)	xiv
3. Mortalité juvénile (0-3mois) (n=27 veaux nés vivants)	xv
4. Durée de gestation (médiane, n=27 veaux nés vivants)	xv
5. Poids de naissance (médiane, n=27 veaux nés vivants)	xv
6. Problèmes ombilicaux (n=25 veaux vivants après 1h d'âge)	xvi
7. Problèmes respiratoires	xvi
8. Veaux mis sous respirateur	xvi

Annexe 3 : Arbre décisionnel pour l'administration du colostrum	xvii
Annexe 4 : Arbre décisionnel pour l'alimentation	xviii
Annexe 5 : Observations supplémentaires non respiratoires sur la santé des veaux clonés.....	xix
1. Problèmes ombilicaux.....	xix
2. Formule hématologique et évaluation du transfert de l'immunité colostrale	xxi

Liste des tableaux

Tableau I : Valeurs des gaz du sang obtenus (n variable selon les paramètres et les moments de prélèvement). ⁶⁷	18
Tableau II : Résumé des causes de morbidité en période néonatale. ⁶⁷	19
Tableau III : Causes de mortalité des veaux clonés. ⁶⁷	19
Tableau IV : Poids moyen des veaux clonés et des témoins. ⁷¹	28
Tableau V : Valeurs des gaz sanguins artériels obtenus des veaux nouveau-nés à 1524m d'altitude (n=30), d'après Adams, 1993	72
Tableau VI : Valeurs des gaz sanguins artériels obtenus des veaux nouveau-nés (n=12), d'après Varga, 1999	73
Tableau VII : Valeurs des gaz sanguins artériels obtenus des veaux nouveau-nés (n=57), d'après Bleul, 2007	73
Tableau VIII : Valeurs des PaO ₂ chez des veaux nouveau-nés entre la naissance et 48h d'âge d'après 3 études ^{123,125,126}	75
Tableau IX : Indications de réglages pour la ventilation mécanique chez le poulain ⁹⁷	93
Tableau X : Résultats des cultures bactériologiques des structures ombilicales infectées	xxi
Tableau XI : Paramètres leucocytaires des 27 veaux clonés à la naissance	xxii

Liste des figures

Figure 1 : Évolution de la température moyenne des veaux clonés et des témoins. ⁷¹	29
Figure 2 : Oxygénation du sang fœtal au passage du placenta, d'après Cuningham ⁷⁵	42
Figure 3 : La circulation fœtale, d'après Cuningham ⁷⁵	43
Figure 4 : Organisation schématique du surfactant dans l'alvéole	50
Figure 5 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine d'après ⁹⁰	77
Figure 6 : Exemple d'anomalies de ventilation/perfusion.....	86
Figure 7 : Incidence des complications ombilicales chez les veaux clonés entre la naissance et l'âge de 3 mois.	xx

Liste des sigles et des abréviations

A-a : gradient alvéolo-artériel en oxygène
ACTH : hormone adrénocorticotrope
AI : insémination artificielle
ALI : acute lung injury
ALT : alanine transférase
ARDS : acute respiratory distress syndrome
AST : aspartate transaminase
ATP : adénosine tri-phosphate
CHUV : centre hospitalier universitaire vétérinaire
CO₂ : dioxyde de carbone
ECMO : extra corporal membrane oxygenation
FiO₂ : fraction inspirée en oxygène
GH : somatotropine
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HCO₃⁻ : taux sanguin en bicarbonates
IGF-I: insulin-like growth factor I
IGF-II: insulin-like growth factor II
IGF-bp : IGF binding protein
IV : intra-veineux
IVF : fécondation *in vitro*
J90 : 90 jours de gestation
NO : monoxyde d'azote
O₂ : oxygène
O₂⁻ : radical superoxyde
PACO₂ : pression partielle alvéolaire en dioxyde de carbone
PAO₂ : pression partielle alvéolaire en oxygène
PaCO₂ : pression partielle artérielle en dioxyde de carbone
PaO₂ : pression partielle artérielle en oxygène
PatmO₂ : pression en oxygène dans l'atmosphère
PvCO₂ : pression partielle veineuse en dioxyde de carbone
PvO₂ : pression partielle veineuse en oxygène

PEEP : positive end-expiratory pressure
PIP : positive inspiratory pressure
PPV : positive pressure ventilation
rpm : respirations par minute
RR : respiratory rate
SatO₂ : saturation du sang en oxygène
T₃ : hormone triiodothyronine
T₄ : hormone thyroxine
V_a : volume alvéolaire
V_a/Q ou V/Q : rapport de ventilation-perfusion
V/Q mismatch : anomalie de ventilation/perfusion
V_d : volume d'espace mort
V_m : ventilation minute
V_{ma} : ventilation alvéolaire minute
V_t : volume tidal
TPR : température, pouls, respiration

Parce que les mots ont une importance

Remerciements

Au Dr Gilles Fecteau,

Pour son soutien, ses conseils et son enthousiasme de chaque jour.

Au Dr Søren Boysen

Pour sa rigueur, son souci du mot juste et sa bonne humeur communicative.

Au Dr Lawrence Smith

Pour la confiance qu'il m'a témoignée et sa lecture attentive.

Au Dr André Desrochers,

Pour avoir accepté de présider le jury.

Au Dr David Francoz,

Pour avoir accepté de participer au jury.

Introduction

Au cours des 20 dernières années, la technique du clonage somatique a permis la naissance d'individus en bonne santé dans plusieurs espèces animales y compris les bovins, ^{1,2}. Parmi les applications du clonage ³, on peut citer la production d'animaux transgéniques ⁴ ou la sauvegarde de patrimoines génétiques d'exception ⁵. Chez les bovins, plusieurs équipes ont produit des veaux clonés et ont rapportés leur expérience ^{2,6-11}. L'efficacité de cette technique demeure limitée. Wilmut ¹² estime à 4% l'efficacité globale du transfert nucléaire (du nombre d'animaux nouveau-nés vivants en bonne santé sur le nombre d'embryons reconstitués), sans considération d'espèce. Un problème rapporté dans l'espèce bovine est la mortalité néonatale élevée ^{10,11,13}. Parmi les principaux problèmes rencontrés à la naissance, notons l'excès pondéral ou « Syndrome du gros veau » ¹⁴, des malformations myoarthrosquelettiques ¹⁵, des difficultés respiratoires ¹⁰ et des anomalies métaboliques ^{16,17}.

Entre 2004 et 2007, le secteur des animaux de ferme du Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint-Hyacinthe - Université de Montréal, a été sollicité à plusieurs reprises pour prendre en charge la naissance et les premiers jours de vie de veaux issus de clonage somatique. L'objectif principal de cette étude est de décrire les anomalies de la fonction respiratoire observées chez ces veaux et d'émettre des hypothèses quant à leur origine. Un objectif secondaire était de décrire l'utilisation de techniques d'évaluation et de soutien de la fonction respiratoire habituellement peu utilisées dans l'espèce bovine. Enfin, un objectif parallèle était de décrire les principales anomalies

de santé dont ont souffert les veaux clonés pris en charge à la Faculté et de les comparer aux anomalies précédemment rapportées.

Chapitre 1 - Revue de la littérature

I. Le clonage somatique chez les bovins

Le clonage est une technique de reproduction asexuée qui donne naissance à un ou des individus ayant le même patrimoine génétique ¹⁸. Chez les mammifères par exemple, la formation de jumeaux identiques ou jumeaux monozygotes est un exemple de clonage naturel. Ce phénomène est assez peu fréquent. On suppose que les jumeaux résultent de la séparation des blastomères d'un embryon avant son implantation dans l'utérus maternel. Les deux embryons qui se développent chacun à partir d'une partie de l'embryon original possèdent la même information génétique puisqu'ils sont issus du même ovocyte fécondé.

I-1. Techniques de clonage

I-1-1. La section embryonnaire

La technique la plus simple est la section embryonnaire. Il s'agit de mimer ce qui se passe lors de la formation de jumeaux monozygotes. Par micromanipulation, un embryon précoce (stade morula ou blastocyste précoce) est sectionné et chaque moitié est replacée dans une zone pellucide afin de reconstituer un embryon. Puis ces embryons néoformés sont transférés dans des mères porteuses pour achever leur développement. L'efficacité rapportée de la technique est de 64% de gestations ¹⁹. Cependant cette technique ne produit qu'un nombre limité d'embryons. De plus cette technique suppose de ne cloner que des embryons, donc des individus en devenir.

I-1-2. Le transfert nucléaire

La technique de transfert nucléaire permet de cloner des organismes à un stade de développement plus avancé (embryon, fœtus, nouveau-né, adulte) et en plus grand nombre. Le principe est de reconstruire des embryons à partir d'ovocytes ovulés évidés et du matériel chromosomique d'une cellule donneuse. Elle se déroule en 7 étapes²⁰:

- Préparation des ovocytes receveurs : Il s'agit le plus souvent d'ovocytes ovulés au stade métaphase 2. Après coloration, la plaque métaphasique et le 1er globule polaire sont extraits de l'ovocyte par micromanipulation.
- Préparation des cellules donneuses qui peuvent être de différentes nature et origine.
- Reconstitution de l'ovocyte en injectant la cellule donneuse sous la membrane vitelline de l'ovocyte évidé.
- Fusion des membranes plasmiques (au moyen d'un champ électrique) et reconstitution d'une seule entité : l'ovocyte cloné.
- Activation de l'ovocyte pour commencer les cycles de multiplications cellulaires. C'est normalement l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte qui déclenche cette cascade d'évènements. *In vitro* le signal d'activation est reproduit par un courant électrique²⁰ et/ou par l'exposition à certaines molécules chimiques telles que du strontium²¹ ou des ionophores calciques²².
- Une fois activé l'ovocyte cloné est incubé *in vitro* pendant quelques jours, par exemple 6 jours pour des moutons²⁰ ou 8-9 jours pour des bovins²². Les blastocystes de qualité suffisante, c'est-à-dire de taille, de couleur et d'architecture normale, seront sélectionnés.
- Les blastocystes sont évalués morphologiquement à 7 jours de culture *in vitro*, et ceux classifiés comme grade 1 et 2 sont considérés comme transférables.

- Les blastocystes sélectionnés sont transférés dans l'utérus de mères porteuses synchronisées pour achever leur développement.

Le principe du transfert nucléaire est le même pour toutes les équipes faisant du clonage. Cependant les protocoles précis sont propres à chaque laboratoire.

I-1-3. Origine des cellules utilisées

I-1-3-a. Les embryons

Dans la technique de section embryonnaire, les embryons peuvent être obtenus par lavage utérin avant que survienne l'implantation, environ 7 jours après l'insémination artificielle. Pour obtenir un plus grand nombre d'embryons, les femelles sont généralement stimulées par des hormones afin d'obtenir plusieurs embryons après fécondation (superovulation).

I-1-3-b. Les ovocytes

Les ovocytes receveurs peuvent être obtenus par super-ovulation chez des femelles vivantes par aspiration des follicules avant ovulation. Ils peuvent également être récoltés par micro-aspiration sur des ovaires obtenus à l'abattoir.

I-1-3-c. Les cellules donneuses de noyaux

Il existe une très grande diversité dans le type de cellules donneuses. Il peut s'agir de cellules embryonnaires obtenues après dissociation des cellules de morula (32 à 64 cellules). Le premier veau issu de transfert nucléaire à partir de cellules embryonnaires est né en 1986 ²³. Les cellules embryonnaires utilisées sont

indifférenciées et totipotentes du fait du stade précoce de prélèvement. Cependant elles ne sont pas facilement accessibles (embryon précoce) et ne sont disponibles qu'en faible quantité (32 à 64 cellules). De plus, le clonage par transfert nucléaire issu de cellules embryonnaires, comme la section embryonnaire, suppose qu'on clone un individu en devenir qui n'a pas encore démontré ses performances.

Les cellules somatiques sont une autre source de cellules donneuses. Il s'agit de cellules issues d'individus adultes, de nouveau-nés ou de fœtus, appartenant à une lignée cellulaire primaire déterminée. Il peut s'agir de cellules souches ou engagées dans une lignée cellulaire. Les fibroblastes constituent le type cellulaire le plus utilisé d'une part parce qu'ils sont faciles d'accès, et d'autre part parce qu'ils peuvent être mis en culture facilement. D'autres types cellulaires ont été utilisés comme les cellules de la granulosa²⁴, de l'oviducte, du foie, de l'oreille (fibroblastes,²⁵) ou de la mamelle²⁰. Le premier mammifère issu de clonage par transfert nucléaire d'origine somatique était une brebis : Dolly, née dans le laboratoire du Pr Wilmut en 1996²⁰. Les avantages à utiliser des cellules somatiques comme donneuses sont nombreux. Elles permettent de cloner des individus déjà nés, des adultes voire des individus décédés si on a pris soin de leur vivant de prélever des cellules et de les congeler, ou de les mettre en culture. La mise en culture est d'ailleurs un autre avantage de cette technique, car de nombreuses cellules somatiques sont faciles à cultiver *in vitro*. De plus, elles constituent une source quasi inépuisable de donneuses et ne limitent donc pas le nombre d'embryons clonés que l'on peut reconstituer. Le transfert nucléaire à

partir de cellules somatiques est un défi puisqu'il remet en cause le caractère irréversible de la différenciation cellulaire. Dans certaines conditions, une cellule différenciée, qui n'exprime qu'une partie de son information génétique et réprime l'autre partie, peut retrouver sa totipotence, c'est-à-dire la capacité à donner naissance un individu complet, normal et fertile. De nombreuses espèces ont été clonées à l'heure actuelle dont : le mouton ²⁰, la vache ²⁵, le cheval ²⁶, la chèvre ²⁷, le porc ²⁸ le lapin ²⁹, le chat ³⁰, le chien ³¹, la souris ³², le rat ³³, mais aussi le loup ^{34,35}.

I-2. Les applications du clonage

Le clonage a de nombreux intérêts dans le domaine de la recherche, qu'elle soit appliquée ou fondamentale. La recherche nécessite parfois de recourir à des animaux d'expérimentation. Il est éthiquement et économiquement important que le nombre de ces animaux soit le plus petit possible, cependant l'analyse statistique nécessite par contre un grand nombre de sujets afin de minimiser les effets des variations individuelles. C'est pourquoi on utilise souvent des lignées de souris consanguines qui ont un fort taux d'homozygotie. L'utilisation d'animaux clonés (et donc complètement homozygotes) minimiserait l'effet individu et permettrait de réduire le nombre de sujets d'expérimentation tout en gardant la même puissance statistique. En 1986, Biggers démontre qu'il est équivalent d'utiliser deux individus clonés ou 40 individus choisis au hasard si on étudie un caractère hautement héritable ³⁶. De plus certains phénotypes difficiles à obtenir pourraient être multipliés plus efficacement par clonage que par reproduction sexuée ³⁷.

En recherche fondamentale, le clonage est également une opportunité d'étudier les mécanismes qui participent au développement embryonnaire et à la formation d'un phénotype à partir du génotype. En effet, les interactions noyau/cytoplasme qui régissent les premières étapes du développement embryonnaires sont une des clefs de la compréhension de la différenciation cellulaire, du vieillissement cellulaire et du processus tumoral.

Les applications zootechniques du clonage sont également nombreuses. Des animaux de grande valeur peuvent être clonés afin d'en diffuser plus largement le patrimoine génétique (taureaux d'insémination, cheval hongre de grande qualité sportive dont on veut des descendants par exemple). Le clonage pourrait participer à la sauvegarde d'espèce ou de race menacée d'extinction^{38,39}. Récemment l'utilisation d'ovocytes de chienne pour cloner une espèce de loup en danger³⁴ ouvre une porte sur la résurrection d'espèce disparue au moyen du clonage.

Le clonage par transfert nucléaire est aussi un moyen relativement simple d'obtenir des animaux transgéniques. Ces animaux peuvent être utilisés pour produire des médicaments ou des biomolécules⁴⁰ dans l'industrie pharmaceutique. D'autre part les animaux transgéniques pourraient servir à produire des organes destinés à des allogreffes⁴¹.

Enfin le clonage est aussi un moyen d'obtenir des cellules souches, pour l'instant uniquement destinées à la recherche fondamentale, mais potentiellement utilisables dans la reconstruction d'organes.

I-3. Efficacité du clonage dans l'espèce bovine

L'efficacité du clonage reste encore faible même si les techniques de conception et de suivi des clones s'améliorent. Les pertes embryonnaires, fœtales et post-natales sont importantes et diminuent le rendement des techniques. Wilmut et al. rapportent une estimation du rendement du clonage somatique, toutes espèces confondues, à moins de 4% ¹². Ce faible chiffre est le résultat de pertes importantes observées à chaque étape du processus de clonage et au cours de la gestation.

Edwards ⁴¹ différencie 5 périodes au cours desquelles on observe des pertes embryonnaires ou mortalités fœtales. *Pour suivre ces étapes, nous évaluerons les pertes en commençant avec 1000 ovocytes prêts à être fusionner et en utilisant toujours les meilleures et les moins bonnes efficacités rapportées.*

I-3-1. Le développement *in vitro* préimplantatoire

Cette période s'étend de la formation de l'ovocyte cloné par fusion au stade blastocyste. Cette étape est préliminaire au transfert de l'embryon dans une receveuse.

Le processus de fusion d'un ovocyte énucléé avec une cellule donneuse permet la formation d'un ovocyte reconstitué. Les pertes lors de la fusion varient de 25% ⁴² à 44% ⁴³ suivant le type de cellule donneuse utilisé et les équipes.

Donc sur 1000 ovocytes, entre 560 et 750 vont donner des ovocytes clonés.

Ensuite, les ovocytes sont activés et reprennent leurs cycles de multiplications cellulaires. ***L'activation*** est une étape complexe. À cette étape, les pertes varient selon

les équipes, les protocoles utilisés et la lignée des cellules donneuses entre 53% à 85%²⁵.

Il reste donc entre 84 et 397 embryons activés.

I-3-2. Le transfert embryonnaire et l'implantation

Les blastocystes de grade 1 et 2 sont transférés dans l'utérus de femelles receveuses, en général à raison de 1 ou 2 par femelle⁴⁴. Les femelles receveuses doivent être synchronisées avec l'âge des embryons reconstitués, afin de maximiser les chances d'implantation et de bon développement de l'embryon^{45,46}.

Pour évaluer le taux de réussite du transfert embryonnaire, il faut évaluer le taux de gestation. Deux principales méthodes diagnostiques sont rapportées : les dosages plasmatiques ou l'échographie. Parmi les dosages plasmatiques, la molécule la plus précocement dosée est la progestérone⁴⁷ à partir de 21 jours de gestation, soit 14 jours après le transfert embryonnaire. D'autres protéines plasmatiques, produites par le placenta et spécifiques de la gestation chez la vache, peuvent également être dosées: la PSPb dès 24 jours de gestation⁴⁸, la PSP60 dès 27 jours de gestation⁴⁹, et la bPAG dès 30 jours de gestation⁵⁰. Heyman⁴⁷ rapportent un taux de pertes lors du transfert des embryons clonés entre 37% et 44% suivant la lignée des cellules donneuses (embryonnaires, somatiques fœtales ou adultes). La gestation est ensuite confirmée par échographie transrectale entre 30 et 35 jours de gestation. Un diagnostic est positif lorsqu'on identifie le fœtus et du liquide la corne utérine

gestante. De plus, la viabilité du fœtus peut être confirmée par l'observation d'un battement cardiaque ⁵¹. Le taux de gestation confirmé par échographie, à 30–35 jours de gestation, varie entre 23% ⁵² et 53% ⁴¹. On peut comparer ce taux de succès à celui du transfert embryonnaire d'embryons conçus *in vivo* (71,9% ⁵³) ou d'embryons conçus par IVF (52,9% ⁴⁷) ou de l'insémination artificielle (65-70% ⁵⁴).

Donc on peut espérer entre 39 et 211 gestations confirmées à 35 jours à partir des 1000 ovocytes initiaux.

I-3-3. Le premier trimestre de gestation (jusqu'à 90 jours de gestation)

Lors de gestations naturelles, ces pertes sont généralement faibles : environ 8,5% pour les taures ^{55,56}. Ce sont les anomalies embryonnaires qui sont la cause la plus fréquente de pertes lors du premier trimestre ⁵⁷. Cependant des anomalies placentaires, des modifications de l'environnement utérin ou des perturbations des interactions fœto-maternelles peuvent également être à l'origine de pertes lors du premier trimestre.

Les pertes de gestations avant 90 jours, lors de gestation de clones, sont évaluées entre 45% ⁴⁷ et 69% ⁵² avec une incidence importante des anomalies placentaires (⁵⁸ chez les bovins, ⁵⁹ chez les ovins). Il s'agit d'anomalies macroscopiques (hypoplasie des cotylédons et de la vascularisation allantoïdienne) et microscopiques (épithélium chorionique aplati et cuboïde). De plus, ces anomalies étaient associées à un retard de croissance des embryons pour leur âge de 90 jours.

L'hypothèse d'une anomalie de reconnaissance des caroncules par l'allanto-chorion a été émise pour expliquer le petit nombre de cotylédons ⁶⁰.

Donc on peut espérer entre 12 et 116 gestations à 90 jours à partir des 1000 ovocytes initiaux.

I-3-4. Les deuxième et troisième trimestres de gestation

Au cours des deuxième et troisième trimestres des gestations naturelles, le taux de mortalité fœtale est inférieur à 5% ⁶¹.

Lors des gestations de clones, des avortements sont fréquemment observés lors des deuxième et troisième trimestres de gestation. Ces pertes varient de 7% ⁵² à 23% des gestations confirmées à J90 ⁷. Ces pertes sont associées à des anomalies placentaires importantes. Macroscopiquement, les placentomes sont moins nombreux (entre 20 et 70 comparés à une centaine lors de gestations normales ⁶²), plus gros et ont une morphologie anormale ^{41,47,62}. Cela pourrait correspondre à un phénomène de croissance compensatrice ⁶³. On observe également des anomalies des membranes fœtales et/ou du fœtus. L'hydropisie des enveloppes a été observée dans 90% des avortements après 90 jours ⁴⁴. L'hydroallantoïde est l'anomalie la plus fréquente ⁴¹ mais on peut également observer des hydramnios, de l'anasarque fœtale et un œdème généralisé de toutes les enveloppes et du fœtus. On observe une croissance asynchrone des organes : les reins et le cœur sont par exemple plus gros, et la rate et

les poumons plus petits, par rapport à ce qu'on observerait chez un veau du même poids/âge ⁷.

Donc on peut espérer entre 9 et 108 gestations menées à terme à partir des 1000 ovocytes initiaux.

I-3-5. Le syndrome du gros veau et la période périnatale

Les veaux clonés souffrent fréquemment d'anomalies de développement qui semblent contribuer à augmenter le taux de mortalité périnatale. Vingt à 30% des veaux clonés à terme meurent à la naissance ou dans les jours qui suivent ^{25,44,52,64,65}. Le taux de mortalité périnatale n'est pas toujours facile à comparer entre les différentes études car la définition de la période périnatale varie de 24h à 7 jours *post-partum*.

Une des premières anomalies observées chez les veaux conçus artificiellement (fécondation *in vitro* ou clonage) est un excès pondéral à la naissance. L'incidence est cependant supérieure chez les individus issus clonage (20% plus gros que des veaux issus de fécondation naturelle ⁶⁶). Cet excès pondéral est rarement une anomalie isolée et l'ensemble des malformations qui affectent les veaux clonés est regroupé sous l'appellation « Syndrome du Gros Veau ». Il est en général associé à un degré plus ou moins important d'hydropisie des membranes fœtales, à une gestation prolongée et à une préparation au vêlage inadéquate des mères porteuses. Les principales anomalies observées lors de Syndrome du Gros Veau sont un excès

pondéral, des difficultés respiratoires, des vaisseaux ombilicaux de taille augmentée associés à des saignements importants à la naissance, des malformations musculo-squelettiques (arthrogrypose, veaux « bulldog », hyperextension des articulations, hyperlaxité ligamentaires et tendineuses), des malformations cardiaques, un réflexe de tétée faible ou absent, une faiblesse généralisée et un taux de mortalité périnatale élevé^{8,64,65,67,68}.

Donc on peut espérer entre 7 et 86 veaux vivants à partir des 1000 ovocytes initiaux.

I-3-6. La période post-natale, sevrage et jusqu'à l'âge adulte

La mortalité post-natale est également anormalement élevée chez les clones.

Avant le sevrage (environ l'âge de 3 mois), le taux de mortalité des veaux clonés issus de clonage somatique est estimé entre 6⁶⁴ et 15%⁸, comparé à 6,7% de mortalité au sevrage chez des veaux normaux (environ 1 mois)⁶⁹. A noter que chez les veaux normaux, la moitié de ces pertes sont dues à des dystocies (ce qui n'est pas le cas chez les veaux clonés qui naissent généralement avec assistance ou par césarienne). Les principales causes de mortalité sont les infections bactériennes (omphalites et pneumonies), les problèmes digestifs (ruminites, abomasites, météorisations aiguës ou chroniques, gastroentérites), les malformations musculosquelettiques non corrigées⁶⁴ et plus occasionnellement des défaillances cardiaques ou rénales, de l'anémie, des désordres métaboliques et immunitaires⁷⁰.

Donc on peut espérer entre 6 et 81 veaux sevrés à partir des 1000 ovocytes initiaux.

Après le sevrage, la mortalité des veaux issus de clonage somatique est estimée entre 4⁵² et 14 %⁴⁴. Les causes de mortalités sont sensiblement les mêmes qu'avant 3 mois en notant que l'incidence des complications ombilicales est fortement réduite.

Donc on peut espérer entre 5 et 78 bovins adultes à partir des 1000 ovocytes initiaux.

I-4. Articles publiés sur la prise en charge des veaux clonés à la naissance

Deux types d'articles décrivent la prise en charge des veaux clonés dans la littérature : il s'agit soit de rapport de cas, soit de situations expérimentales. Les rapports de cas sont rétrospectifs et concernent la prise en charge de veaux clonés comme des patients d'une unité de soins intensifs (les analyses complémentaires sont effectuées selon l'état du patient, absence de témoins). Les études expérimentales sont prospectives et incluent des analyses faites en grand nombre selon une cédule prédéfinie. Elles incluent également des témoins élevés dans les mêmes conditions afin de permettre des comparaisons.

I-4-1. Garry et al. 1996. ⁶⁷

Il s'agit d'un rapport d'une série de cas.

Animaux

Trente-neuf veaux mâles et 1 veau femelle, issus de clonage embryonnaire, ont été inclus dans l'étude. Ils sont nés à terme par césarienne (la chirurgie a été réalisée au moment du vêlage, sans manipulation obstétricale). Dix-sept lignées cellulaires, issues de cellules embryonnaires (blastomères), étaient inégalement représentées. Les veaux pesaient en moyenne 48,5 kg (26,4 à 67,3 kg) après 293,2 jours de gestation en moyenne (+/- 7,7 j), et 10/40 étaient teintés de méconium.

Prise en charge à la naissance

Trente-quatre veaux sur quarante ont reçu un soutien médical d'intensité variable : réanimation (4/40), oxygénothérapie (34/40), réchauffement (19/40), antibiothérapie (11/40), fluidothérapie (9/40). Sept veaux sur quarante souffraient de malformations myoarthrosquelettiques. Dans les 2 premières heures après la naissance, 9/40 veaux ont reçu leur colostrum via un tube œsophagien. Par la suite 34/40 veaux ont été intubés pour recevoir leur repas de lait. Dix d'entre eux n'ont pas retrouvé leur appétit, malgré une PaO₂ revenue à la normale. La moyenne de temps nécessaire aux veaux pour se lever était de 7 h et 9 min (écart type de 16 h et 12 min).

Analyses sanguines

Des prélèvements sanguins veineux ont été réalisés entre 5 et 60 min suivant la naissance, afin de mesurer la glycémie, la lactatémie, la concentration d'acides gras libres, et le taux de glucagon, insuline, GH, T3, T4, cortisol et IGF-1 mais seuls 21 veaux ont fourni des échantillons en quantité suffisante. Les résultats ont été comparés avec des références précédemment établies sur 26 veaux de boucherie de type croisé nés par vêlage de difficulté variable. Les prélèvements sanguins de référence ont été recueillis 10 min après la naissance. Les seules différences observées entre les clones et les témoins concernaient les hormones T3 et T4 qui étaient plus élevées chez les témoins, et l'insuline plus basse également chez les témoins.

Des prélèvements sanguins artériels ont été recueillis à 10, 30 et 60 min *post-partum*, et analysés immédiatement. Les veaux étaient hypoxémiques, légèrement hypercapniques et présentaient une acidose mixte (respiratoire et modérément métabolique). Leur glycémie était normale. Les résultats sont reportés dans le Tableau I. À noter que pour les valeurs des gaz sanguins, seuls les prélèvements des veaux clonés qui ne recevaient pas d'oxygène au moment du prélèvement, ont été rapportés par les auteurs.

Tableau I : Valeurs des gaz du sang obtenus (n variable selon les paramètres et les moments de prélèvement).⁶⁷

Paramètres Moyenne+/- écart-type Médiane (min – max)	10 minutes	30 minutes	60 minutes
pH	7,19 +/- 0,14 7,22 (6,68-7,35) n=28	7,27 +/- 0,07 7,28 (7,13-7,40) n=21	7,28 +/- 0,14 7,30 (6,73-7,38) n=21
PaO2 (mmHg)	38,1 +/-14,0 34,2 (15,9-75,8) n=28	42,1 +/-10,6 40,8 (29,1-60,8) n=21	45,2 +/-11,4 44,2 (21,6-67,1) n=21
PaCO2 (mmHg)	60,1 +/- 17,9 59,4 (26,5-137,4) n=28	51,6 +/- 6,3 50,5 (42,4-61,2) n=21	51,5 +/- 12 48,2 (39,7-98,7) n=21
HCO3- (mmol/L)	22,1 +/- 4,8 22,6 (7,4-29,2) n=28	22,7 +/- 4,3 21,7 (14,2-29,3) n=21	22,9 +/- 3,9 23,5 (11,8-29) n=21
Glucose (mmol/L)	3,7 +/- 1,87 3,72 (1,33-8) n=33	4,11 +/- 2,98 3 (0,61-13,56) n=29	4,64 +/- 2,95 3,78 (1,56-16,22) n=32
Lactate (mmol/L)	10,8 +/-6,27 9,8 (3,5-28) n=27	NA	8,9 +/- 5,5 8,1 (1,7-24,5) n=29

Résultats de survie et de morbidité

Le taux de morbidité à la naissance et dans les 48h post-partum s'élevait à 34/40 (85%). La durée moyenne d'hospitalisation était de 2,3 jours (+/- 3 jours) avec 21/34 veaux qui sont demeurés à l'hôpital moins de 1 journée. Les causes de morbidité figurent dans le Tableau II.

Tableau II : Résumé des causes de morbidité en période néonatale. ⁶⁷

Réanimation à la naissance	4/34
Réchauffement	19/34
Alimentation forcée et support nutritionnel	34/40
Oxygénothérapie	34/40
Antibiothérapie intraveineuse	11/34
Fluidothérapie intraveineuse	9/34

Parmi les 39 veaux retournés vivants à la maison après leur hospitalisation de naissance, 12 (31%) ont été réadmis l'hôpital. Les causes de réadmission à l'hôpital ont été des omphalites (5/12), de la diarrhée (4/12), des pneumonies (5/12), des anomalies de conformation des membres (1/12), et une septicémie (1/12).

La mortalité en période périnatale était de 1/40, soit 2.5%, (1 veau mort à 29h d'aspiration de méconium et de septicémie). La mortalité à 3 mois était de 7/39, soit 17,9%. Les causes de mortalité figurent dans le Tableau III.

Tableau III : Causes de mortalité des veaux clonés. ⁶⁷

Causes infectieuses (6)	<ul style="list-style-type: none"> 1 aspiration de méconium à 29 heures 1 pneumonie à <i>Pasteurella spp</i> à 14 semaines 1 pneumonie à <i>Pseudomonas spp</i> (entre 7 et 18 jours) 1 septicémie à <i>E.coli</i> (entre 7 et 18 jours) 1 défaillance multi-organique consécutive à une septicémie (entre 7 et 18 jours) 1 rotavirose + abcès ombilical + polyarthrite fibrineuse à 4 semaines
-------------------------	---

Causes non infectieuses (2)	1 torsion du mésentère à 3 semaines 1 insuffisance cardiaque sans malformation congénitale à 9 semaines
-----------------------------	--

Discussion

Les observations rapportées sont cohérentes avec celles faites précédemment à propos des veaux issus de clonage embryonnaire et de fécondation *in vitro*, et plus tard à propos des veaux issus de clonage somatique. Les auteurs soulignent également la grande variabilité entre les veaux. La faiblesse, un faible réflexe de succion et un délai à se mettre debout ont été considérés par les auteurs comme des facteurs de risques de morbidité/mortalité pour le veau nouveau-né. Dès l'observation de ces signes cliniques, ils ont pratiqué les examens cliniques et complémentaires qu'ils ont jugés appropriés et mis en place des traitements. Certaines analyses (prises de sang veineux et artériel pour biochimie et analyse des gaz du sang) ont cependant été faites systématiquement à intervalles prédéfinis afin d'évaluer la santé des veaux. D'après les signes cliniques observés : faiblesse, hypoxémie, acidose métabolique, hypothermie et hypoglycémie, les auteurs ont émis l'hypothèse d'un défaut dans le métabolisme énergétique des veaux clonés. Ils ont par la suite réalisé un certain nombre d'analyses biochimiques supplémentaires afin d'investiguer le métabolisme énergétique. Leur hypothèse est qu'une anomalie dans la régulation énergétique fœto-maternelle intra-utérine pourrait être une cause ou un facteur de risque pour les affections néonatales dont souffrent les veaux clonés. De plus, l'environnement

auquel est soumis l'embryon précoce lors de la technique de clonage pourrait être en cause.

Commentaires

Points forts : le nombre assez important (n = 40) de veaux inclus dans cette étude, l'environnement hospitalier, les résultats de laboratoires assez détaillés.

Il faut garder à l'esprit que l'hôpital d'accueil de ces veaux clonés se situe à Fort Collins dans le Colorado à 1524 m altitude. Les valeurs des gaz sanguins, et notamment de la PaO₂, peuvent être comparées aux valeurs relevées par Adams et al. (1993) dans les mêmes conditions atmosphériques. Cependant elles ne peuvent pas être comparées à des valeurs obtenues à une altitude inférieure. Pour information, la pression atmosphérique à 1554 m est d'environ 620 mmHg (contre 760 mmHg au niveau de la mer) dont 21% d'oxygène soit une pression partielle en oxygène dans l'alvéole de 121 mmHg (vs 150 mmHg au niveau de la mer, en appliquant la formule 21% de (Patm - Pression de vapeur d'eau saturante)) soit une diminution de 20%.

La prise en charge des veaux clonés s'est faite sur la base de leur état clinique et des résultats d'examens de laboratoires (gaz du sang, hématologie et biochimie). Le principal indice pour entamer des examens complémentaires était la faiblesse des veaux et leur lenteur à se mettre debout, à boire ou à aller vers leur mère. Les auteurs n'avaient pas de plan de soins préétablis. Toutes leurs interventions étaient curatives et précoces par rapport à l'apparition du problème. Cette approche se différencie

d'autres équipes de recherche qui ont préféré apporter des soins systématiquement dès la naissance.

Limites : Les auteurs eux-mêmes rappellent qu'ils n'ont pas inclus dans les résultats les analyses des veaux les plus gravement atteints parce qu'ils recevaient déjà des traitements aux moments des prélèvements. Ainsi les anomalies dans les valeurs de biochimie et de gaz sanguins peuvent être sous-évaluées par rapport à la réalité du fait que les plus anormaux ne figurent pas dans les résultats. Ils justifient également le fait de se limiter à la première heure *post-partum* parce que c'est le moment où ils avaient le plus de données. La moitié des veaux (21/40) est restée à l'hôpital moins de 24h. Ainsi certaines anomalies plus tardives et faiblement débilitantes ont possiblement pu passer inaperçues, notamment du fait de l'absence d'analyses sanguines.

I-4-2. Hill et al. 1999. ⁶⁸

Il s'agit d'un rapport d'une série de cas.

Animaux

Treize veaux transgéniques sont décrits dans cet article. Il s'agit de 5 fœtus mort-nés ou avortés (223 à 278 jours de gestation) et de 8 veaux nés vivants nés à terme (entre 277 à 288 jours de gestation vs une moyenne pour la race de 277+/-1 jours). Les veaux nés vivants pesaient entre 44 à 58,6 kg (médiane et moyenne de 50,6 kg). Six naissances ont été induites à 284 jours de gestation avec des

corticostéroïdes (+/- prostaglandines), une parturition a été induite avant le terme prévu pour cause d'hydroallantoïde sévère d'évolution rapide, et une vache est venue spontanément en travail à 280 jours de gestations. Ces veaux sont tous des veaux transgéniques issus d'une seule lignée cellulaire fœtale.

Prise en charge

Le premier veau cloné de l'étude est né un peu avant terme à cause d'hydroallantoïde. Il a été mis sous oxygène pendant les premières 15 minutes post-partum. Le veau était alerte respirait spontanément de façon correcte et tentait de se lever. Cependant son réflexe de tétée était faible. Il a été gardé sous surveillance pendant les 3 heures suivantes en évaluant fréquemment ses fréquences cardiaque et respiratoire, sa température rectale et son attitude. Trois heures après la naissance, le veau a montré des signes de détresse respiratoire et l'analyse des gaz sanguins a montré une hypoxémie sévère, une hypercapnie et une acidose métabolique et respiratoire. La prise en charge du veau a ensuite inclus une surveillance des gaz sanguins, une oxygénothérapie intranasale, une fluidothérapie additionnée de glucose ou de bicarbonates suivant les résultats biochimiques. Le veau a également reçu des antibiotiques. La détresse respiratoire s'est aggravée et le veau a été mis sous respirateur et nutrition parentérale. Les signes cliniques suivants ont été associés à de l'hypertension pulmonaire chronique : hypoxémie ($PaO_2 = 20$ mmHg sous 5 L/min d'oxygène intranasal soit environ 100 ml/kg/min), hypercapnie modérée ($PaCO_2 = 59$ mmHg), faible élévation de la PaO_2 suite à l'augmentation du débit d'oxygène

intranasal puis la mise sous respirateur (augmentation maximale à 156 mmHg sous ventilation mécanique puis diminution de nouveau à 57 mmHg à 13 h d'âge après 3 heures de ventilation mécanique). Le veau est mort à 4 jours d'âge. La nécropsie a confirmé le diagnostic de déficience du surfactant : pneumonie interstitielle atypique avec prolifération des pneumocytes II, histiocytose alvéolaire, dépôts de protéines dans la lumière des alvéoles et présence de quelques macrophages multinucléés ; surimposé à une hypertension pulmonaire chronique : hypertrophie (augmentation de la lumière et de l'épaisseur de la paroi) du coeur droit avec présence de tissu fibroélastique à la surface de l'endocarde, diamètre de l'artère pulmonaire plus grand que celui de l'aorte, persistance d'un ductus arteriosus de 8mm de diamètre, congestion hépatique et diamètre des vaisseaux ombilicaux estimés à 3 fois la normale. Suite à l'observation de ce veau et aux résultats de la nécropsie, la prise en charge des veaux suivants a été révisée.

Les autres veaux sont tous nés par césarienne sauf un dont le vêlage a été naturel. Ils ont systématiquement reçu de l'oxygène pendant au moins 30 minutes ou jusqu'à normalisation des gaz sanguins. Ils ont reçu leur colostrum dans les 60 minutes suivant la naissance. Quatre veaux sur sept souffraient d'hypoxie à la naissance qui s'est régularisée avec l'oxygénothérapie. Deux veaux sur sept ont reçu du surfactant et 2 autres veaux ont développé une pneumonie quelques jours après la naissance. Le surfactant utilisé était du surfactant frais obtenu par lavage de poumons de bovins adultes en bonne santé, obtenus à l'abattoir. Le lavage a été fait avec de la

saline stérile contenant 100 000 UI/L de pénicilline potassium et 50 mg/L de gentamicine. Après le lavage, le surfactant forme un film mousseux à la surface de la solution. Le surnageant mousseux est ensuite prélevé et conservé à 5°C avant utilisation. Le surfactant a été soumis à des cultures bactériologiques aérobies et anaérobies qui se sont révélés négatives.

Examens complémentaires

Les analyses sanguines réalisées l'ont été dans un but diagnostique. Seuls les résultats des gaz sanguins artériels ont été rapportés. Des nécropsies ont été pratiquées sur le veau mort à 4 jours et sur 5 fœtus mort-nés ou avortés. Elles ont révélé notamment 1 fœtus anasarque, et 2 fœtus avec des signes d'hypertension pulmonaire chronique. Les signes nécropsiques d'hypertension pulmonaire chronique étaient de la congestion hépatique passive chronique et une hypertrophie du ventricule droit.

Résultats de survie et de morbidité

La morbidité en période néonatale s'élève à 6/8 (75%). On observe des difficultés respiratoires chez 5 de ces veaux (5/8 soit 62%), des gros vaisseaux ombilicaux (2/8 soit 25%) et des malformations tendineuses (2/8 soit 25%). Sur les 13 veaux présentés, 4 peuvent être considérés comme des avortons (durée de gestation <270 jours) et 1 comme mort-né (278 jours de gestation). Des 8 veaux nés vivants, 1 est mort dans les 4 jours d'une affection présente dès la naissance. La mortalité néonatale était de 1/8 (12%).

La mortalité après la période néonatale et l'âge de 3 mois est de 1/7 (14%). Le veau souffrait de détresse respiratoire, sans pneumonie associée, avait un cœur élargi et dilaté, et est mort à 6 semaines.

Discussion

Les observations faites sur le premier veau né vivant et lors des nécropsies, ont permis d'adapter la prise en charge des veaux suivants à la naissance. Une démarche plus agressive a été adoptée notamment sur l'administration d'oxygène de façon préventive dans les 30 minutes suivant la naissance.

Du surfactant bovin frais a été utilisé de façon curative chez 2 veaux montrant des signes de détresse respiratoire. Son efficacité n'a pas pu être évaluée car les traitements de soutien respiratoire utilisés étaient différents.

Des anomalies cardio-pulmonaires ont été fréquemment observées aussi bien chez les veaux nés vivants (5/8, 62%) que chez les fœtus mort-nés ou avortés (4/5, 50%). Les auteurs ont relevé l'association fréquente d'un placenta œdémateux et de signes d'hypertension pulmonaire, et considèrent le premier comme un indicateur possible du second. Les conséquences des anomalies de placentation sur les échanges gazeux fœto-maternels sont encore inconnues. Les causes des anomalies de placentation pourraient être les manipulations *in vitro* ou la transgénèse dont sont issus ces veaux.

Commentaires

Points forts de l'étude : la description détaillée des signes cliniques et de la prise en charge des veaux, la différence de traitement entre le premier veau et les suivants, le nombre élevé de gaz sanguins.

Limites : certains résultats de gaz sanguins artériels sont difficiles à interpréter. La PaO₂ mesurée alors que l'animal respire l'air ambiant (21% d'oxygène) est parfois largement supérieure à 100 mmHg (111 ou 120 mmHg). Il est généralement admis qu'un animal respirant de l'air ambiant au niveau de la mer ne peut avoir une valeur de PaO₂ supérieure à 100 mmHg. Une contamination de l'échantillon ou une erreur d'écriture pourraient expliquer cette observation.

De plus l'hypothèse d'hypertension pulmonaire n'a pas été démontrée par la mesure de la pression dans le tronc pulmonaire (invasive ou par doppler) qui est la définition l'hypertension pulmonaire en médecine humaine.

I-4-3. Chavatte-Palmer et al. 2002 ⁷¹

Il s'agit d'une étude expérimentale.

Les objectifs de l'étude étaient de : 1- comparer certains paramètres cliniques et endocriniens entre des veaux clonés d'apparence normale et des veaux contrôles issus d'insémination artificielle et de fécondation *in vitro* ; 2- décrire les anomalies affectant les placentas des fœtus clonés dont la gestation est anormale lors des 2 derniers trimestres.

Seul le premier objectif est en rapport avec notre étude.

Animaux

Dans cette étude, 21 veaux clonés issus de 3 lignées cellulaires ont été comparés à 194 veaux témoins dont 174 issus d'insémination artificielle (AI) et 20 issus de fécondation *in vitro* (IVF). Tous les veaux étaient en bonne santé à la naissance. Dix-huit veaux clonés sur 21 sont nés par césarienne à terme, 2/21 sont nés par césarienne 1 semaine avant-terme et 1/21 est né à terme par vêlage naturel. Deux veaux témoins sur 194 sont nés par césarienne tandis que les autres sont nés par vêlage naturel.

Paramètres évalués

Les veaux clonés étaient plus lourds ($p < 0,001$) à la naissance que les témoins issus de IVF et de AI malgré une durée de gestation similaire. Les poids moyens des veaux sont présentés dans le Tableau IV.

Tableau IV : Poids moyen des veaux clonés et des témoins. ⁷¹

Veaux	poids à la naissance en kg moyenne (écart-type)
clones n=16	55,1 (2,7)
IVF n=20	45,7 (1,5)
AI n=176	43,7 (0,5)

La température a été suivie deux fois par jour pendant les 7 premiers jours de vie afin de détecter une augmentation de la température précédemment observée par l'équipe de recherche parmi leurs animaux clonés. Les clones (n = 10) avaient une

température moyenne plus élevée que les témoins (n = 10). Les auteurs ont observé des élévations de température souvent supérieures à 41°C pendant 24 à 36h et ne répondant pas aux anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les auteurs ont conclu à de l'hyperthermie paradoxale car les conditions environnementales étaient tempérées.

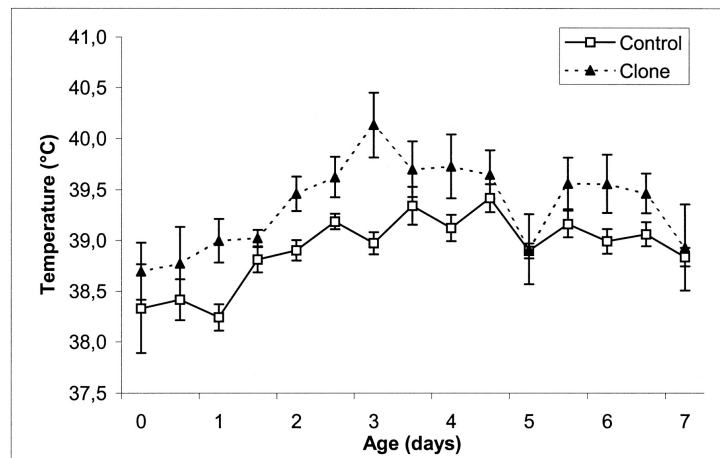


Figure 1 : Évolution de la température moyenne des veaux clonés et des témoins. ⁷¹

L'hémogramme complet n'a pas montré de différences entre clones (n = 21) et témoins (n = 8 AI) sauf un volume cellulaire moyen plus important chez les clones ($50 \times 10^{12} \pm 1,3 \times 10^{12}$ L vs $43,6 \times 10^{12} \pm 0,6 \times 10^{12}$ L). Les paramètres biochimiques suivants ont été évalués sur les mêmes animaux sauf pour la glycémie : AST, ALT, urée, créatinine, fibrinogène, glucose (clones = 6, témoins = 6). Aucun des paramètres n'étaient statistiquement différents entre clones et témoins.

Les concentrations plasmatiques d'IGF II (clones = 7, témoins = 5) et de leptine (clones = 6, témoins = 5) étaient plus élevées chez les clones tandis que celle

de T4 (clones = 7, témoins = 4) était plus faible. Les autres paramètres évalués : IGFbp (clones = 7, témoins = 5), IGF I (clones = 7, témoins = 5), GH (clones = 5, témoins = 6) et insuline (clones = 6, témoins = 6) n'ont pas montré de différences entre clones et témoins. La réponse du cortisol plasmatique suite à une stimulation par l'ACTH était différente entre les veaux nés par césarienne et ceux nés naturellement mais pas entre clones et témoins.

Discussion

Il semble que les veaux clonés sont différents des veaux témoins pour un certain nombre de paramètres. Certaines différences, comme la concentration plasmatique d'IGF II, pourraient être la conséquence d'un défaut de reprogrammation nucléaire puisque ce gène est connu comme étant un gène à empreinte parentale. Cependant d'autres différences, comme la leptine ou l'hyperthermie paradoxale, ne trouvent pas d'explication du même type puisqu'il ne s'agit pas d'un gène à empreinte parentale.

Commentaires

Point forts de l'étude : il s'agit d'une étude expérimentale prospective dans laquelle la prise de données était rigoureusement cédulées. Cette étude démontre qu'il existe peu de différences cliniques entre les veaux clonés nés en bonne santé et les témoins nés de IVF ou d'AI.

Limites : le nombre de veaux étudiés pour chacun des paramètres biochimiques est différent et la sélection des individus testés n'est pas expliquée : cela pourrait biaiser l'analyse si la sélection entre les clones et les témoins des animaux à tester n'est pas aléatoire. De plus on ne sait pas si ce sont les mêmes animaux qui ont fait de l'hyperthermie et qui ont été testés pour l'hormone thyroïdienne par exemple.

I-4-4. Panarace et al. 2007 ⁴⁴

Il s'agit d'une étude rétrospective qui rapporte les observations faites dans 3 pays différents (USA, Argentine et Brésil), lors de la conception, la naissance et la vie de clones d'intérêts commerciaux. Je ne détaillerai que la partie se rapportant à la naissance et à la période jusqu'à 150 jours.

Animaux

Trois cent quatre-vingt-huit veaux sont nés entre 2000 et 2005, issus de 97 lignées différentes. Entre 2000 et 2002, 100% des veaux sont nés par césarienne 7 à 10 jours avant la date prévue pour le terme de la gestation. Puis à partir de 2003, les équipes ont laissé les gestations arriver à terme voire dépasser le terme de 3 à 5 jours, et si le vêlage n'était pas spontané, ils l'induisaient en utilisant des prostaglandines F2 α et de la dexaméthasone. Si le travail était induit, ils observaient le vêlage en l'assistant au besoin ou pratiquaient une césarienne. Les veaux pesaient en moyenne 40 +/- 8 kg, 44 +/- 13 kg et 45 +/- 8 kg selon les pays.

Prise en charge

À la naissance le cordon ombilical était ligaturé au besoin et désinfecté avec une solution iodée. Si le veau avait des mouvements respiratoires, il recevait de l'oxygène par un masque, sinon il était intubé et ventilé avec de l'oxygène à l'aide d'un « Ambu bag ». Une évaluation clinique était faite 6, 12 et 24 heures après la naissance. Les paramètres observés étaient la température rectale, la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, la vigilance et le temps nécessaire à se mettre debout et à téter. De plus en Argentine à 12 h, 24 h et 7 jours d'âge, l'hématocrite, les protéines totales et le taux d'immunoglobulines étaient mesurés pour estimer l'état d'hydratation et le transfert de l'immunité, de même qu'une analyse des gaz du sang veineux et un ionogramme étaient faits sur des prises de sang veineux jugulaire. Si l'équipe suspectait un processus infectieux, un hémogramme était réalisé et des antibiotiques étaient administrés.

Le veau était laissé avec la mère porteuse et libre de téter. Cependant si son réflexe de succion était faible, si la mère avait un pis peu développé ou si le veau avait des difficultés à se mettre debout, il recevait 4L de colostrum au biberon ou par intubation œsophagienne en 3 repas dans les 8 heures *post-partum*.

Résultats de survie et de morbidité

Sur les 388 veaux nés, 28% sont morts dans les premières 48h, (18% sont morts lors de la naissance et 10% dans les 48h qui ont suivis). Quatorze pourcent supplémentaires sont morts entre l'âge de 48h et l'âge de 150 jours. Les problèmes

respiratoires sont la cause de décès la plus fréquemment rapportée. Seuls 4 veaux (1%) ont été euthanasiés pour graves déformations arthro-squelettiques.

Les principales anomalies observées chez les veaux clonés de cette étude étaient un gros cordon ombilical (37%), des contractures des tendons (21%), de la faiblesse extrême et un retard à se lever (20%), des problèmes respiratoires (19%), des hypo/hyperthermies (17%), une persistance du canal de l'ouraqué (10%).

Soixante-quinze pour cent des veaux ont reçu des antibiotiques selon les indications suivantes : hyperthermie, gros cordon ombilical et/ou persistance du canal de l'ouraqué.

Les résultats des gaz sanguins veineux montraient que le pH des veaux clonés augmentait entre 12h et 7 jours d'âge (de 7,2 à 7,3), de même que la glycémie (de 0,64 +/- 0,31 à 1,18 +/- 0,34 g/l) tandis que la PvCO₂ (de 57,7 +/- 22,4 à 44,9 +/- 5,4 mmHg), le lactate (de 6,6 +/- 4,8 à 1,8 +/- 1,3 mmol/l) et l'hématocrite (de 36,6 +/- 6,7 à 32,6 +/- 6,6) diminuaient. Mais aucune analyse statistique n'a été réalisée.

Commentaires

Points forts de l'étude : cet article rapporte des observations à large échelle faites en parallèle d'une production de clones commerciaux. Un très grand nombre de veaux a été inclus dans l'étude augmentant la valeur statistique des observations.

Limites : on regrettera l'absence d'un réel taux de morbidité et un tableau indiquant les fréquences des principales causes de décès différenciées entre avant 24

h et entre 2 et 150 jours. La prise en charge ainsi que la surveillance des veaux est également plus variable et limitée que celle pratiquée par un hôpital.

I-4-5. Batchelder et al. 2007^{72,73}

Il s'agit d'une étude expérimentale. Je présenterai en même temps les deux articles car il s'agit de la même étude, sur les mêmes animaux, qui a été rapportée en 2 volets.

L'objectif était de comparer des veaux clonés et des veaux issus de transfert embryonnaire par rapport à : 1- leurs caractéristiques physiques et cliniques, 2- la morphologie de leur placenta, 3- leurs profils hématologiques et biochimiques. Je ne détaillerai pas la partie relative aux placentas. Les observations ont été faites à la naissance et lors de premières 48h *post-partum*.

Animaux

Huit veaux clonés ont été inclus dans l'étude. Trois sont des clones d'une vache Hereford de 13 ans (issus de trois lignées cellulaires : fibroblastes n=1, cumulus n=1 et granulosa n=1), et 5 sont des clones d'une vache Holstein de 3 ans (issus de 3 lignées cellulaires : cumulus n=2, granulosa n=2 et follicule préantral n=1). Tous les veaux sont nés par césarienne 33h après induction de la parturition avec des corticostéroïdes et des prostaglandines F2 alpha à 280 jours de gestation. Les veaux Holstein pesaient en moyenne 37,1kg (28-48kg) et les veaux Hereford 57 kg (50-71kg). Les moyennes de poids à la naissance chez les veaux Holstein sont

39.8 kg pour les femelles et 43.2 kg pour les mâles ⁷⁴. Les moyennes de poids à la naissance chez les veaux hereford sont 40.7 kg pour les femelles et 43.2 kg pour les mâles (d'après le Canadian Hereford Association).

Six veaux (3 Holstein et 3 Hereford), issus de transfert embryonnaire constituent les témoins de cette étude. Trois sont nés par césarienne après le même protocole d'induction que pour les clones, et les trois autres sont nés naturellement après induction, avant l'heure prévue pour la césarienne (après 273-280 jours de gestation). Trois veaux Holstein ont alors été inclus dans l'étude. Ils sont issus d'insémination artificielle et sont nés par césarienne lors du terme spontané de la gestation (269-279 jours de gestation). Les veaux Holstein témoins pesaient en moyenne 39,4 kg (31,5-48 kg) et les Hereford 37,6 kg (31,5-48 kg).

Prise en charge

Lors de la césarienne, le cordon ombilical était ligaturé proximale et distalement, puis rompu par étirement entre les 2 ligatures. L'ombilic était ensuite désinfecté avec une solution iodée à 7% toutes les 8 heures. Les voies respiratoires du veau étaient libérées des fluides fœtaux puis il était mis en décubitus sternal et frictionné. De l'oxygène lui était administré au masque dès la naissance pendant 30 minutes au moins et jusqu'à ce que son état général soit jugé satisfaisant. Après la pesée et dans les 3 h *post-partum*, 2L de colostrum étaient administrés au biberon ou par un tube œsophagien s'il refusait le biberon. De plus, 800 ml de plasma étaient administrés IV en 40 minutes dans les 2h *post-partum*. Un cathéter jugulaire était

également mis en place afin de réaliser les prélèvements sanguins et d'administrer un traitement antibiotique prophylactique systématique (amikacine et ampicilline).

Examens réalisés

La température rectale, le pouls et la fréquence respiratoire (TPR) étaient relevés à 10 min, 1, 6, 12, 18, 24, 36 et 48h *post-partum*. De plus, les auteurs ont noté si le veau était coloré par son méconium à la naissance, le temps nécessaire au veau pour se lever, pour boire, la morphologie du veau et s'il avait des déformations des membres, la taille des structures ombilicales et la persistance du canal de l'ouraqué.

Des prélèvements sanguins ont été effectués aux mêmes moments que les TPR. Les paramètres suivants ont été évalués dans le sang veineux : glucose, urée, créatinine, créatine kinase, aspartate aminotransférase, phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, sorbitol deshydrogénase, bilirubine totale, fructose, sucrose, sorbitol, sodium, potassium, chlorure, calcium, lactate, PCO₂, PO₂, pH, bicarbonates. De plus un hémogramme complet a été effectué.

Résultats de survie et de morbidité

Tous les veaux sont nés vivants et était encore vivant à 48 h d'âge. Les auteurs rapportent une ou plusieurs des anomalies suivantes chez tous les veaux clonés : coloration par du méconium, réflexe de tétée médiocre, déformations arthro-squelettiques, gros cordon ombilical, hémorragie ombilicale, persistance du canal de l'ouraqué, retard à se lever ou se nourrir. On peut donc considérer le taux de

morbidity à 100% chez les clones. Un veau cloné est mort à 72 h d'âge. Le taux de mortalité néonatale est donc de 1/8 soit 12%.

Principaux résultats et discussion

Les principales différences observées entre les veaux clonés et les témoins étaient le temps nécessaire pour se mettre debout (retard chez les clones), la taille de l'ombilic (plus gros chez les clones), la température (38,6°C pour les veaux clonés à 1h d'âge vs 39,4°C pour les témoins), la glycémie (hypoglycémie à la naissance chez les clones 2,19 mmol/L vs 4,08 mmol/L chez les témoins, hyperfructosémie chez les clones à la naissance 8,1 vs 5,2 mmol/L chez les témoins), la formule érythrocytaire (numération des hématies : 6,8 (clones) vs 8,6 x 10¹² /L à la naissance, hémocrite : 26 (clones) vs 34%).

Les auteurs concluent que les clones ont plus de difficultés à s'adapter à la vie extra-utérine et rapprochent ce constat des anomalies placentaires également observées.

Commentaires

Points forts de l'étude : étude détaillée et très complète du point de vue des analyses effectuées. La comparaison avec des veaux témoins est également très valorisante.

Limites : on peut regretter le nombre restreint de sujets inclus dans l'étude. De plus plusieurs lignées et races ont été utilisées ce qui est une source de différence

entre les clones. La présentation de certains résultats, à savoir utiliser une moyenne alors que les n sont petits et y associer un minimum-maximum plutôt qu'un écart-type, est imparfaite. Enfin les auteurs n'ont pas rapporté la cause de la mort du veau cloné mort à 72h d'âge.

II. Les maladies respiratoires en période néonatale chez le veau

La naissance est un moment critique chez tous les mammifères. Durant la gestation, le placenta fournit au fœtus des nutriments et de l'oxygène en provenance du sang maternel et assure l'élimination des déchets. De plus, le placenta est une source d'enzymes et d'hormones qui modifient le métabolisme maternel et fœtal. Enfin, l'ensemble des membranes fœtales et l'utérus assure au fœtus un environnement atraumatique, stable et chaud, lui épargnant les dépenses énergétiques de thermorégulation.

Au moment de la naissance, en quelques minutes seulement, le fœtus se sépare de sa mère et du placenta, et doit assurer ces fonctions par lui-même. L'oxygénation du sang est assurée par le tractus respiratoire tandis que les nutriments sont puisés d'abord dans les faibles réserves puis rapidement dans l'alimentation. L'élimination de l'urine se fait *via* l'urètre vers le milieu extérieur et non plus par le canal de l'ouraque vers l'allantoïde. Les apports alimentaires du nouveau-né doivent couvrir son métabolisme de base, sa thermorégulation et sa croissance. Le défi est important et une défaillance lors de ces transitions peut mettre en danger la survie du nouveau-né.

La seconde partie de cette revue de littérature aura pour objet l'oxygénation du sang et la transition du système cardio-respiratoire fœtal à celui du nouveau-né, les problèmes qui peuvent survenir durant la période périnatale, ainsi que les méthodes diagnostiques et thérapeutiques disponibles.

II-1. La transition du système cardio-respiratoire lors de la naissance

II-1-1. Organisation du système cardiovasculaire fœtal

Le système circulatoire du fœtus est anastomosé avec le placenta *via* les artères et la veine ombilicales. Le placenta sert de surface d'échanges respiratoires au fœtus. Le sang fœtal désoxygéné arrive par les artères ombilicales au placenta, se sature en oxygène (de 58 à 80 %, figure 2) et retourne au fœtus par la veine ombilicale.

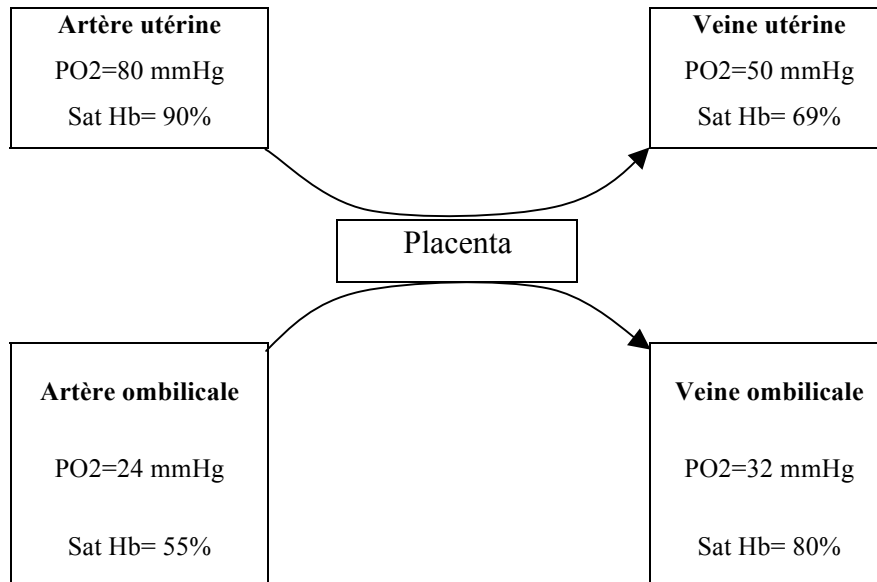


Figure 2 : Oxygénation du sang fœtal au passage du placenta, d'après Cuningham⁷⁵

Chez le fœtus, la circulation systémique et la circulation pulmonaire sont en dérivation plutôt qu'en série comme chez l'adulte. Deux dispositifs de shunts existe dans le cœur fœtal et dirige le sang oxygéné vers la circulation systémique plutôt que vers la circulation pulmonaire. Le sang oxygéné est mêlé à du sang désoxygéné dans la veine cave caudale pour ensuite atteindre le cœur droit. Cinquante pour-cent du sang est dérivé de l'oreillette droite vers l'oreillette gauche à travers le *foramen ovale* tandis que le ventricule droit reçoit les 50% restants qui se mélangent au sang désoxygéné provenant de la veine cave crâniale. Ce mélange est ensuite propulsé par la systole dans l'artère pulmonaire où se situe le deuxième dispositif de shunt.

L'artère pulmonaire est anastomosée avec l'aorte via le *ductus arteriosus*. Il s'agit d'une valve maintenue ouverte par une différence de pression sanguine entre la circulation pulmonaire et la circulation systémique. Au final, seul 10% du débit cardiaque passe par les poumons.

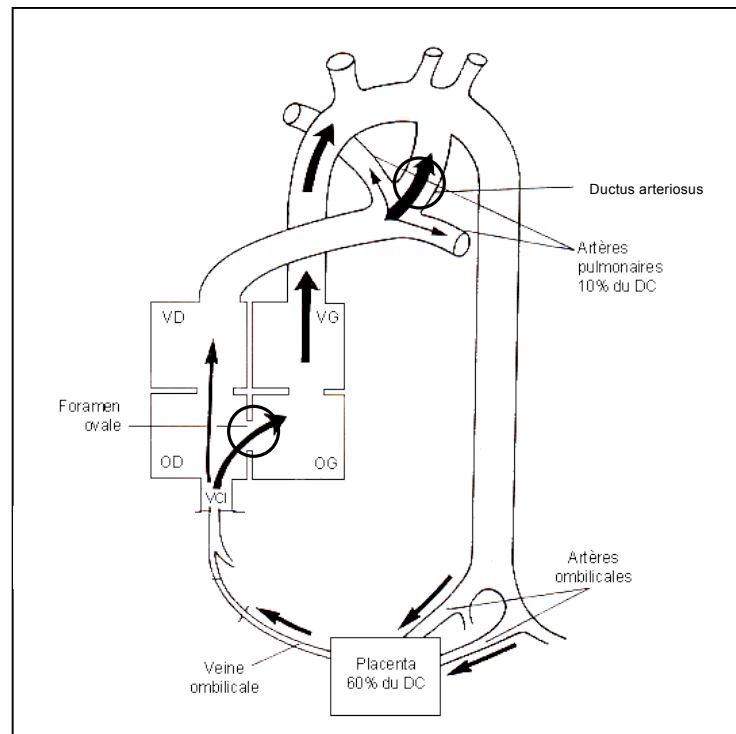


Figure 3 : La circulation fœtale, d'après Cuningham ⁷⁵

Lors de la vie fœtale, les alvéoles sont collapsées et l'arbre trachéo-bronchique est occupé par un liquide pulmonaire sécrété par les cellules épithéliales ⁷⁶. Les poumons fœtaux sont des organes à forte résistance vasculaire. Les vaisseaux sont donc comprimés. De plus, la faible pression partielle en oxygène dans le sang

circulant ($\text{PaO}_2=38 \text{ mmHg}$ ⁷⁷) stimule la vasoconstriction des artérioles pulmonaires. Cela contribue à ce que la pression dans la circulation pulmonaire fœtale soit importante. D'autre part le placenta est un organe à faible résistance vasculaire. Chez les bovins, il reçoit environ 60% du débit cardiaque fœtal⁷⁷. La présence du placenta diminue la résistance vasculaire de la circulation systémique fœtale. Le sang prend toujours le chemin de moindre résistance et la différence de résistance vasculaire est responsable du passage du sang à travers le *foramen ovale* et le *ductus arteriosus*.

En conclusion, la circulation pulmonaire fœtale est une circulation à faible débit (seul 10% du débit cardiaque passe par les poumons), à forte résistance vasculaire et donc à forte pression, et faiblement oxygénée ($\text{PaO}_2 = 38 \text{ mmHg}$). La circulation systémique fœtale est une circulation à grand débit, à faible résistance vasculaire et donc faible pression et assez bien oxygéné.

II-1-2. Transition à la naissance de la circulation fœtale vers la circulation d'adulte

II-1-2-a. La séparation du placenta

Lors de la naissance, le passage dans la filière pelvienne comprime partiellement le cordon ombilical ce qui réduit le débit sanguin dans les vaisseaux ombilicaux. Puis le cordon s'étire et se rompt, privant le nouveau-né de sa source d'oxygène. Cette séparation a deux conséquences principales : i) rapidement le nouveau-né devient hypoxique et hypercapnique en 4 à 8 minutes⁷⁸, ce qui stimule le réflexe de respiration et ii) la perte du placenta, organe ayant une faible résistance

vasculaire, augmente la résistance globale de la circulation systémique, augmentant ainsi la pression sanguine systémique moyenne qui passe de 47 +/- 4 mmHg chez le fœtus ⁷⁹, à 85-110 mmHg chez le veau de 24 heures d'âge ^{80,81}.

II-1-2-b. La première inspiration

La première inspiration du veau nouveau-né est déclenchée par 3 stimuli : (i) l'hypoxie et l'hypercapnie, (ii) le refroidissement provoqué par la sortie de l'utérus et par l'évaporation des fluides fœtaux sur la peau, et (iii) la stimulation mécanique produite par les léchages de la mère. Ce premier mouvement respiratoire dans l'air demande un effort important lors de l'inspiration pour rompre les tensions de surface et déployer une partie des alvéoles pulmonaires collapsées, et lors de l'expiration pour faire circuler l'air dans les voies respiratoires inférieures elles aussi pleines de liquides. Par la suite, la présence d'air et de surfactant dans les alvéoles les empêche de s'effondrer à chaque expiration, diminuant les efforts musculaires nécessaires pour respirer. Seule une partie des alvéoles se déploie lors de la première inspiration. Les inspirations suivantes (de plus en plus faciles) permettent l'insufflation de l'ensemble du poumon.

II-1-2-c. Transition de la circulation fœtale en circulation d'adulte

La première étape est une modification des pressions dans les circulations pulmonaires et systémiques.

Le déploiement des alvéoles diminue la compression sur les vaisseaux pulmonaires. De plus, le sang pulmonaire s'oxygène au contact des alvéoles ventilées, ce qui lève en partie la vasoconstriction hypoxique des vaisseaux pulmonaires. Ces deux mécanismes entraînent une diminution de la résistance vasculaire et par conséquent de la pression moyenne dans les artères pulmonaires de 80 mmHg chez le fœtus à 62 mmHg chez le veau nouveau-né de 4 heures d'âge ⁸⁰. Dans le même temps, la pression dans la circulation systémique a augmenté. La pression pulmonaire devient plus faible que la pression systémique (62mmHg vs 85-110 mmHg, ⁸⁰). Les deux conséquences sont que le *foramen ovale* se ferme et que le sang change de sens dans le *ductus arteriosus* (de l'aorte vers l'artère pulmonaire ⁸⁰). Le *foramen ovale* se ferme dans les 5 à 20 minutes qui suivent la naissance ⁷⁷. Le *ductus arteriosus* après avoir été exposé à du sang oxygéné en provenance du cœur gauche, devient non fonctionnel en 4 à 5 minutes ⁷⁷.

Les circulations systémique et pulmonaire ne communiquent plus entre elles et la totalité du sang passe par les poumons. La circulation d'adulte s'établit avec une circulation pulmonaire décrite comme à faible pression et haut débit et une circulation systémique à haute pression et haut débit.

II-1-3. Le fluide pulmonaire

Dans l'utérus, l'épithélium pulmonaire sécrète un liquide appelé liquide pulmonaire. Ce liquide pulmonaire est sécrété à un rythme de 25 ml/kg lors du dernier trimestre de gestation chez l'agneau ⁷⁶ et envahit l'ensemble des voies respiratoires inférieures et supérieures. Lors de mouvements respiratoires, qui commencent durant le 2ème tiers de la gestation, le fœtus déglutit ou expire ce liquide dans la cavité amniotique, équilibrant ainsi la quantité de liquide dans les poumons ⁸². Chez l'homme, la quantité de liquide pulmonaire est évaluée à 60-100 ml/kg en fin de gestation ⁸². Chez l'agneau, la production de liquide diminue en fin de gestation pour atteindre 18 ml/kg quelques jours avant la naissance ⁸³. Parallèlement, les poumons commencent à réabsorber le liquide pulmonaire par des mécanismes actifs dus à des pompes à sodium. Ce phénomène intervient lors des derniers jours de gestation et surtout lors de la parturition ⁸⁴. Il pourrait contribuer à faciliter la fonction respiratoire à la naissance ⁸⁵. Ainsi la transition vers la respiration pulmonaire est préparée avant même le début de la parturition afin de faciliter les premières respirations et la mise en place d'un ratio ventilation/perfusion adéquat.

II-2. Les anomalies respiratoires en période périnatale en médecine humaine et vétérinaire

II-2-1. Anoxie du nouveau-né

En pédiatrie humaine, l'anoxie du nouveau-né est une encéphalopathie résultant d'un manque d'oxygène à la naissance ⁸⁶. Cela se produit lorsque la circulation ombilicale est compromise (compression du cordon ombilical, torsion utérine, rupture prématurée du cordon ou décollement placentaire) trop longtemps avant que le nouveau-né ne soit capable de respirer seul efficacement. Les signes cliniques sont une diminution de la conscience et du tonus musculaires, puis de la léthargie, une diminution des réflexes centraux (réflexes photomoteurs par exemple), une disparition des réflexes tendineux et l'installation d'une flaccidité musculaire. Lorsque les signes cliniques évoluent depuis moins de 24h, ils sont généralement réversibles. Au-delà, le pronostic devient sombre.

Chez le veau, en conditions expérimentales ⁷⁸, les signes d'hypoxie sont une hyperactivité, une diminution du rythme cardiaque et une diminution de la pression artérielle. La mort survient en 6 à 8 minutes. À la nécropsie, les lésions d'asphyxie sont peu caractéristiques. On peut observer des pétéchies sur l'épicarde, la plèvre et le thymus. De plus si le veau était déjà en souffrance fœtale *in utero*, il peut avoir expulsé son méconium et être jaune. On peut également retrouver des particules de méconium dans le tractus respiratoire ^{87,88}.

L'hyperactivité observée est probablement le résultat des efforts du nouveau-né pour respirer. Par contre, la léthargie rapportée en médecine humaine chez le nouveau-né est vraisemblablement une séquelle de l'hypoxie survenue lors de la naissance. Il est donc possible d'imaginer qu'un veau ayant souffert d'hypoxie à la naissance mais n'en étant pas mort puisse développer le même état léthargique rapporté en médecine humaine.

II-2-2. Le Syndrome de Détresse Respiratoire du nouveau-né

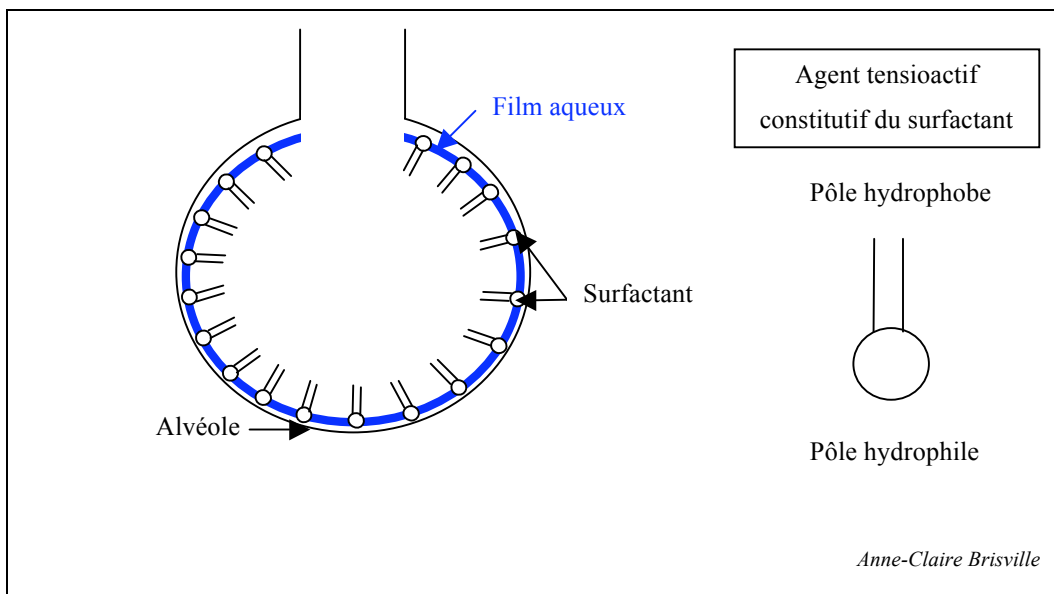
Le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né a d'abord été identifié en médecine humaine. Il est dû à une déficience de surfactant et affecte principalement les nouveau-nés prématurés. Son incidence est en relation avec le degré de prématurité ⁸⁹. En pédiatrie, ce syndrome est aussi appelé maladie des membranes hyalines.

II-2-2-a. Le surfactant – étiopathogénie du syndrome de détresse respiratoire

Le surfactant est un ensemble d'agents tensioactifs ⁹⁰. Les alvéoles sont tapissées par un film aqueux qui les protège et dissout les gaz respiratoires. Les molécules d'eau exercent entre elles des forces d'attraction due à la formation de liaison hydrogène. Cette force d'attraction est appelée tension de surface. À chaque expiration, la tension de surface entraîne le collapse incomplet des alvéoles. Cela participe au caractère passif de l'expiration. Cependant si l'alvéole se collapse complètement, le travail nécessaire au redéploiement de l'alvéole lors de l'inspiration suivante est très important.

Les éléments tensioactifs du surfactant possèdent un pôle hydrophile et un autre hydrophobe. Dans l'alvéole, ils se positionnent de telle façon que les pôles hydrophiles viennent au contact des molécules d'eau et les pôles hydrophobes se retrouvent vers le centre de l'alvéole au contact de l'air (figure 4). Les forces d'attraction entre les pôles hydrophobes des molécules tensioactives sont 12 fois moins fortes que celles existants entre les molécules d'eau⁹⁰. Le surfactant évite que les alvéoles ne collapsent complètement à chaque expiration et diminue ainsi le travail nécessaire pour les redéployer à chaque inspiration.

Figure 4 : Organisation schématique du surfactant dans l'alvéole



Le surfactant est constitué de phospholipides, de protéines et d'ions parmi lesquels : le dipalmitoylphosphatidylcholine et lécithine, les apoprotéines SP A, B et C, et le cholestérol⁹⁰. Il est produit par les pneumocytes de type II lors du dernier

tiers de gestation ⁹⁰. Chez l'homme, on considère que les poumons sécrètent suffisamment de surfactant pour permettre la respiration aérienne à partir de 35 semaines de gestation (terme 38 semaines) soit 92% de la durée de la gestation ⁸⁹. Chez l'agneau, le surfactant est présent en quantité suffisante pour permettre au nouveau-né de respirer normalement à partir de 125 à 130 jours de gestation (terme à 148 jours) soit 86 à 90% de la durée totale de gestation ⁹¹. On peut extrapoler qu'il en est de même chez le veau, bien qu'aucune étude ne l'ait clairement démontré. Si on transpose la situation de l'agneau au veau, on pourrait estimer que les poumons du veau seraient matures à partir de 90 % de la durée de la gestation, soient 250 jours (terme à 280 jours) ⁸⁸. Cependant il a été observé que les veaux nés par césarienne après induction avant 270 jours de gestation, sont fréquemment victimes du syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né ⁹².

Chez l'homme, l'hypoxie, l'asphyxie, l'ischémie associée à l'hypovolémie et à l'hypotension, ou le stress hypothermique peuvent inhiber la synthèse de surfactant ⁸⁹. De plus, des lésions épithéliales pulmonaires dues à des hautes concentrations d'oxygène ou à l'usage du respirateur, peuvent diminuer la synthèse de surfactant ⁸⁹.

Enfin, chez l'homme, le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né est considéré comme un facteur prédisposant à l'hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né ⁸⁹.

II-2-2-b. Les manifestations cliniques et pathologiques

La maladie a été bien décrite chez l'homme et l'agneau. Certaines observations ont également été rapportées chez le veau.

Chez l'homme, les signes cliniques apparaissent généralement dans les minutes qui suivent la naissance. Les nouveau-nés ont une fréquence respiratoire anormale et des efforts respiratoires augmentés. Leur respiration est superficielle ⁹³. Le nouveau-né souffre d'hypoxie consécutivement aux anomalies respiratoires. La dyspnée est due à la faible compliance pulmonaire et la tachypnée est secondaire aux échanges gazeux inadéquats.

Chez le veau, le principal signe clinique est l'augmentation des efforts respiratoires ⁹². Une étude rapporte un taux de mortalité de 11 morts sur 20 veaux atteints. Huit sont morts dans la première heure tandis que les 3 autres sont morts dans les 3 premiers jours de vie. Un article récent fait le point sur le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né ⁹⁴. Les veaux semblent normaux à la naissance et les signes cliniques apparaissent 10 à 15 minutes après la naissance. Les veaux deviennent dyspnéiques et ont des mouvements respiratoires exagérés avec la participation de la musculature abdominale qui évolue vers de la discordance. Dans une étude rétrospective sur 20 cas ⁹⁵, le diagnostic de syndrome de détresse respiratoire néonatale était établi sur la présence de 2 des 4 signes suivants : tachypnée, ($\text{rpm} > 45\text{rpm}$), augmentation des efforts respiratoires (avec une respiration abdominale), hypoxémie ($\text{PaO}_2 < 60\text{mmHg}$) et hypercapnie ($\text{PaCO}_2 > 45\text{mmHg}$). Il ne s'agit donc pas d'un diagnostic étiologique mais présomptif. Les signes cliniques

choisis sont peu spécifiques et pourraient inclure toutes les maladies respiratoires y compris infectieuses.

Chez l'homme, lors de l'examen pathologique, la principale lésion macroscopique est une hépatisation rouge du poumon ⁸⁹. Chez le veau, on observe également de l'œdème interstitiel et alvéolaire ⁹². À l'examen microscopique, on observe de l'atélectasie extensive. Du sang, des débris, du liquide amniotique et du méconium sont parfois observés dans les alvéoles. Les membranes hyalines caractéristiques de la maladie sont des protéines qui sont sécrétées dans la lumière alvéolaire. Elles ne sont visibles que si la maladie évolue depuis plus de 6 heures chez l'homme ⁸⁹. Chez le veau, une surinfection bactérienne peut s'installer car des lésions de bronchopneumonie sont décrites chez 2 veaux morts à 28 et 60h d'âge ⁹².

II-2-2-c. Diagnostic

En médecine humaine, la présentation clinique du Syndrome de Détresse Respiratoire du nouveau-né est peu spécifique et ressemble à la plupart des maladies respiratoires néonatales. Le premier examen complémentaire utilisé est la radiographie du thorax. L'image caractéristique est un patron alvéolaire avec un effacement de la silhouette cardiaque et des bronchogrammes, cependant cette image n'est pas pathognomonique ⁹².

L'analyse des gaz du sang montre des changements également peu spécifiques mais permet d'évaluer la sévérité de la maladie ⁸⁹. Chez le veau, l'hypoxémie et

l'hypercapnie sont 2 des critères utilisés pour diagnostiquer le Syndrome de Détresse Respiratoire. Cependant ces changements peuvent être dus à d'autres atteintes respiratoires.

En médecine humaine, l'analyse du liquide amniotique peut être un indicateur *ante-partum* du risque pour le nouveau-né de développer un Syndrome de Détresse Respiratoire ⁸⁹. Au cours de la gestation et particulièrement lors du dernier tiers, le fœtus a des mouvements respiratoires. Une partie du fluide pulmonaire est « expiré » dans le liquide amniotique. La maturation pulmonaire se traduit par la modification du ratio lécithine/sphingomyéline dans le liquide amniotique. Cet indicateur est utilisé en médecine humaine pour déterminer la viabilité pulmonaire du fœtus à risque de naître prématurément. Un rapport supérieur à 2 est considéré comme indicatif d'un poumon mature : le nouveau-né aurait moins de 5% de risque de développer un syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né. Au contraire, un rapport inférieur à 2 fait suspecter une immaturité pulmonaire et un risque accru pour le nouveau-né d'être atteint du syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né ⁹⁶. Le ratio lécithine/sphingomyéline a également été mesuré chez des veaux nouveau-nés ⁹². Les veaux n'ayant pas eu de problème respiratoire en période néonatale avaient un ratio de 2.6, comparé à un ratio de 1.5 pour les veaux ayant souffert syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né ⁹²

En conclusion, aucun test n'existe pour diagnostiquer le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né. Il s'agit d'un diagnostic présomptif basé sur les signes cliniques, l'âge du patient et la réponse au traitement.

II-2-2-d. Traitement

En médecine humaine, le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né est le plus souvent autolimitant et les nouveau-nés finissent par sécréter du surfactant en quantité suffisante. Le traitement recommandé est de soutenir la fonction respiratoire du nouveau-né jusqu'à qu'il puisse l'assurer seul. Il s'agit de maintenir les PaO₂ et PaCO₂ dans des valeurs compatibles avec la vie, de même que résoudre l'acidose métabolique et l'insuffisance circulatoire si elles se manifestent ⁸⁹.

L'administration d'oxygène tiède et humidifié est recommandée de façon à maintenir la PaO₂ du nouveau-né entre 55 et 70 mmHg et une saturation de l'hémoglobine en oxygène (SatO₂) supérieure à 90% ⁸⁹. Chez le poulain, les objectifs de traitement utilisés sont ⁹⁷ : une PaO₂ entre 80 et 110mmHg et/ou une SatO₂ supérieure à 92%. Des débits de 6 à 10 L/min sont utilisés pour atteindre ces objectifs chez les poulains nouveau-nés ⁹⁷. Chez l'homme, on recommande de ne pas administrer plus que 60% d'oxygène inspiré ⁸⁹. En médecine vétérinaire on fait varier le débit d'oxygène intranasal qu'on administre. Chez le chien, une étude a établi, chez des individus adultes et en bonne santé, la fraction d'oxygène inspirée en fonction du débit d'oxygène intranasal administré ⁹⁸. Avec une canule intranasale, les équations de prédiction de la FiO₂ et de la PaO₂ sont :

$$FiO_2 = 19,94 + (0,187 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

$$PaO_2 = 100,74 + (0,924 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

Avec 2 canules intranasales, les équations sont :

$$FiO_2 = 22,42 + (0,286 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

$$PaO_2 = 116,92 + (1,45 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

Regardons un exemple numérique pour un chien de 20 kg (comme utilisé dans l'étude) recevant 100 ml/kg/min/canule sur 2 canules :

$$20 \times 100 \times 2 = 4 \text{ L/min soit } 2 \times 2 \text{ L d'O}_2/\text{min}$$

$$PaO_2 = 262 \text{ mmHg et } FiO_2 = 51 \%$$

Le même type d'étude a été faite chez le poulain.

Avec une canule intranasale les équations de prédiction de la FiO_2 et de la PaO_2 sont :

$$FiO_2 = 17,33 + (0,1297 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

$$PaO_2 = 91,93 + (0,8247 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

Avec 2 canules intranasales, les équations sont :

$$FiO_2 = 17,33 + (0,2665 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

$$PaO_2 = 91,93 + (1,4513 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

Regardons un exemple numérique pour un poulain de 60 kg (comme utilisé dans l'étude) recevant 100 ml/kg/min/canule sur 2 canules :

$$60 \times 0,100 \times 2 = 12 \text{ L/min soit } 2 \times 6\text{L d'O}_2\text{/min}$$

PaO₂ = 237 mmHg et FiO₂ = 44 % donc un poulain recevant entre 6 et 10L O₂/min comme suggéré par Palmer ⁹⁷, le pourcentage de FiO₂ inspiré par le poulain serait inférieur à 40%.

Aucune étude de ce genre n'a été rapportée chez le veau. On ne connaît donc pas la fraction d'oxygène inspirée par un veau en fonction du débit d'oxygène intranasale qu'on lui administre. On administre généralement le plus petit débit répondant aux objectifs fixés ⁹⁷ (voir partie II.3.1 plus loin).

II-2-2-e. Prévention

La principale prévention du syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né est d'éviter les naissances prématurées. Dans le cas contraire, l'administration de corticostéroïdes à la mère 48 h avant la date programmée de la parturition réduit l'incidence du syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né et sa mortalité ⁸⁹. La béthaméthasone a été montrée efficace en médecine humaine avec un délai de 48h entre l'administration et la parturition ⁹⁹. Chez les bovins, l'administration de fluméthasone 30h avant la parturition augmente le rapport lécithine/sphingomyeline ¹⁰⁰. Il en a été déduit que cela améliorerait la maturation pulmonaire et réduisait le risque de Syndrome de Détresse Respiratoire.

II-2-3. Tachypnée transitoire du nouveau-né

La tachypnée transitoire du nouveau-né est décrite en médecine humaine chez les enfants légèrement prématurés ou nés à terme. Elle se manifeste par l'apparition d'une tachypnée (à partir de 60 rpm et jusqu'à 140 rpm comparé à la fréquence respiratoire normale qui est de 30 à 60) ¹⁰¹ dans les 6h qui suivent la naissance. Les signes cliniques d'hypoxie sont modérés et inconstants et son évolution est favorable en 3 à 4 jours ¹⁰². La tachypnée transitoire du nouveau-né est généralement considérée comme secondaire à un retard de la résorption du fluide pulmonaire qui occupe le tractus respiratoire ¹⁰³ au cours de la gestation. Au moment de la naissance ce fluide est majoritairement et rapidement résorbé par l'épithélium pulmonaire ¹⁰³. Un syndrome similaire est également décrit chez le poulain ¹⁰⁴. La tachypnée transitoire idiopathique du poulain est généralement observée dans un environnement chaud et humide, et les animaux affectés souffrent également d'hyperthermie. Cette maladie est considérée comme un déséquilibre de la thermorégulation du poulain ¹⁰⁴. Enfin, en néonatalogie humaine, la naissance par césarienne a été identifiée comme un facteur de risque d'apparition de la tachypnée transitoire du nouveau-né ¹⁰³.

II-2-4. Pneumonie par aspiration

II-2-4-a. L'étiopathogénie

L'hypoxie est l'un des stimuli qui déclenche, chez le fœtus, le réflexe de respirer. La privation prolongée ou sévère d'oxygène, *in utero* ou lors de la parturition, peut conduire le fœtus à commencer à respirer prématurément, alors qu'il

est encore dans l'utérus ou dans la filière pelvienne. Il va alors inspirer et faire entrer dans les voies respiratoires supérieures des matériaux étrangers tels que du liquide amniotique ou des débris tissulaires provenant des voies génitales. Ces « corps étrangers » vont créer des obstructions dans les bronchioles les plus fines et perturber les échanges gazeux. Cinq à 15 % des enfants naissent « teintés » par du méconium⁸⁹. L'émission du méconium est généralement considérée comme un signe de souffrance fœtale. La naissance de veaux hypoxiques « jaunes » a précédemment été rapportée^{78,105}. Du méconium peut donc également être présent parmi les matériaux étrangers inspirés accidentellement par le nouveau-né. L'aspiration de méconium est une entité pathologique bien identifiée que ce soit en médecine humaine¹⁰⁶ ou en médecine bovine⁸⁸.

II-2-4-b. Les signes cliniques

En médecine humaine, les nouveau-nés présentant une pneumonie par aspiration ne souffrent généralement pas de signes respiratoires sévères en début de condition⁸⁹. 30% des enfants ont besoin d'assistance ventilatoire. Les signes cliniques se manifestent dans les premières heures de vie. Il s'agit de tachypnée et d'une augmentation des bruits respiratoires. De la cyanose peut apparaître chez les individus gravement atteints. Un pneumothorax ou un pneumomédiastin peuvent également se développer⁸⁹. Ces signes sont les conséquences de l'obstruction des voies respiratoires inférieures. La radiographie thoracique montre alors un patron alvéolaire localisé, une augmentation du volume thoracique et un aplatissement du

diaphragme ⁸⁹. Les cas les plus sévères évoluent vers une détresse respiratoire. Des hémorragies pulmonaires et de l'œdème ont également été rapportés ¹⁰⁷. De plus lors de pneumonie par aspiration de méconium, certains facteurs interfèrent avec la fonction du surfactant (albumine, protéine, phosphatidylsérine) ce qui pourrait prédisposer le nouveau-né à un syndrome semblable au syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né

II-2-4-c. Le traitement et la prévention

La majorité des cas sont modérément dyspnéiques et hypoxiques et leur état s'améliore spontanément avant 72h ⁸⁹. L'administration d'oxygène peut améliorer l'oxygénation. Les nouveau-nés faibles et léthargiques requièrent plus d'attention s'ils naissent teintés de méconium. Les cas les plus sévères nécessitent parfois un temps de réanimation au cours duquel il est profitable d'intuber le nouveau-né et d'aller aspirer le contenu des voies respiratoires via le tube trachéal. Un traitement classique de soutien de la fonction respiratoire est également instauré afin de limiter l'hypoxie avec, au besoin, une assistance respiratoire mécanique. L'utilisation du lavage broncho-alvéolaire avec du surfactant dilué a été investiguée et semble profitable à des enfants en grande détresse respiratoire placés sous oxygénation extracorporelle ^{108,109} : il s'agit d'une technique qui associe la circulation extracorporelle et une membrane oxygénante. Cette technique est efficace mais très invasive et réservée aux unités néonatales de soins intensifs.

Enfin si la pneumonie par aspiration se complique d'une pneumonie bactérienne, une antibiothérapie doit être instaurée.

II-2-5. Hypertension pulmonaire primitive ou persistance de la circulation fœtale

II-2-5-a. L'étiopathogénie

La persistance, après la naissance, de la circulation fœtale et du shunt droit-gauche du sang via le *foramen ovale* et le *ductus arteriosus* est due au maintien d'une forte résistance vasculaire dans la circulation pulmonaire. Celle-ci peut être causée soit par une maladie primitive du parenchyme pulmonaire (telle que la maladie des membranes hyalines, la pneumonie par aspiration, une pneumonie septique), soit par une anomalie structurelle de la vascularisation pulmonaire (par exemple un épaissement des muscles lisses de la paroi des artérioles pulmonaires en réponse à une hypoxie fœtale chronique, ou un rétrécissement du ductus arteriosus consécutive à une exposition aux anti-inflammatoires non stéroïdiens), soit par une hypoplasie pulmonaire congénitale (par exemple lors de hernie diaphragmatique) ¹¹⁰. La conséquence de la persistance de la circulation fœtale est l'installation et la persistance d'hypoxémie puis d'hypoxie.

II-2-5-b. Les signes cliniques

Les signes cliniques peuvent être présents dès la naissance, mais s'installent généralement dans les 12 premières heures de vie. Le nouveau-né humain est tachypnéique, cyanosé et présente une insuffisance respiratoire d'installation

progressive avec une hypoxie sévère et une PaCO₂ qui peut être normale ou augmentée ⁸⁹. La radiographie pulmonaire peut être normale, si l'hypertension persistante est associée à une asphyxie, ou caractéristique de la cause primitive d'installation de l'hypertension persistante (lésion de pneumonie ou hernie diaphragmatique) ⁸⁹.

Chez le veau, les signes d'hypertension pulmonaire persistante incluent tachypnée, hypoxie ne répondant pas bien à l'oxygénothérapie et tachycardie ⁶⁸. De plus à l'échocardiographie, on peut observer une hypertrophie du cœur droit, visible également à la radiographie thoracique ⁶⁸ et en nécropsie. Enfin à la nécropsie, les lésions caractéristiques d'hypertension pulmonaire sont : une congestion passive chronique du foie, une dilatation du cœur droit associée à un épaississement de la paroi du ventricule droit, une fibrose élastique de l'endocarde de l'atrium et du ventricule droits, un diamètre de l'artère pulmonaire supérieur à celui de l'aorte et la persistance du *ductus arteriosus* ⁶⁸.

II-2-5-c. Le diagnostic

Le diagnostic repose en grande partie sur la présentation clinique (notamment la cyanose), l'absence de réponse à l'oxygénothérapie et la présence de causes primitives. Le shunt droite-gauche peut être visualisé par échocardiographie munie d'un doppler ⁸⁹.

II-2-5-d. Le traitement

Le principe du traitement initial est de corriger les facteurs qui participent à maintenir la vasoconstriction des artères pulmonaires tels que l'hypothermie, l'hypoglycémie ou l'anémie. Il convient également de corriger la hernie diaphragmatique si elle est présente. Le rétablissement de l'oxygénation sanguine est indispensable pour éviter les lésions systémiques d'une part, et pour lever le réflexe pulmonaire de vasoconstriction hypoxique d'autre part ⁸⁹.

L'hypoxie est constante dans les cas d'hypertension pulmonaire persistante, et ne répond généralement pas à l'apport d'oxygène. Cependant une amélioration transitoire peut être observée lorsque le shunt est incomplet ¹¹¹.

Le monoxyde d'azote (NO) a un effet vasodilatateur sur les artérioles pulmonaires. L'administration de NO directement dans le tube endotrachéal permet une action locale et sélective sur la vascularisation pulmonaire, et retarde voire évite des méthodes d'oxygénation artificielle plus agressives ¹¹¹. Si l'oxygénation ne peut pas être maintenue avec le NO et de l'oxygène intranasal, le recours à la ventilation mécanique est nécessaire jusqu'à ce que le changement de circulation se fasse. Dans certains cas, la ventilation mécanique n'est pas assez efficace pour augmenter le taux d'oxygène sanguin parce que les lésions pulmonaires sont trop importantes ou parce que les pressions appliquées par le respirateur sont telles qu'elles sont préjudiciables au fonctionnement cardiaque en limitant le retour veineux et risquent d'aggraver les lésions pulmonaires. Ces cas très sévères peuvent être pris en charge par ECMO ou oxygénation extracorporelle ¹¹¹. Il s'agit d'une circulation extracorporelle associée à

un passage du sang *via* une membrane permettant les échanges gazeux : oxygénation et élimination du dioxyde de carbone. Elle suppose une double canulation artérioveineuse ou veino-veineuse et une héparinisation complète du sang du nouveau-né, et ne peut être envisagée que dans des centres de soins intensifs pédiatriques de très haute technicité.

II-2-6. Les complications pulmonaires de maladies systémiques: Acute Lung Injury (ALI) et Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

II-2-6-a. La définition et les signes cliniques

ALI et ARDS sont des syndromes d'insuffisance respiratoire qui se développent en association avec une autre maladie sévère. Il s'agit de la manifestation d'un processus inflammatoire systémique ¹¹². ARDS est la manifestation extrême d'ALI. ALI et ARDS sont définis selon les critères suivants ¹¹³:

i)- la présence d'une défaillance respiratoire (dyspnée, tachypnée, toux sèche, agitation éventuellement cyanose, crépitements à l'auscultation des poumons),

ii)- l'infiltration bilatérale des poumons à la radiographie thoracique, avec une distribution périphérique des lésions,

iii)- une hypoxémie réfractaire caractérisée par un ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ pour ALI, et < 200 pour ARDS, et

iv)- l'absence d'insuffisance cardiaque gauche.

L'hypoxémie est généralement sévère tandis que la PaCO₂ reste normale ou diminue légèrement en raison d'hyperventilation.

II-2-6-b. La pathophysiologie

Les trois caractéristiques patho-physiologiques de ALI et ARDS sont une augmentation de la perméabilité vasculaire, une diminution de la diffusion alvéolaire et une augmentation du shunt droite/gauche ¹¹⁴.

Des lésions endothéliales conduisent à une augmentation de la perméabilité vasculaire dont la conséquence est un œdème pulmonaire non-cardiogénique. Les lésions épithéliales concernent dans un premier temps les pneumocytes de type I qui nécrosent, puis touchent les pneumocytes de type II ¹¹⁵. Cela provoque l'afflux de cellules inflammatoires et d'un exsudat dans le tissu interstitiel, et interfère dans les mouvements des fluides pulmonaires. La présence de cellules et de molécules inflammatoires inactive en partie le surfactant. Si les pneumocytes de type II sont sérieusement endommagés, la production de surfactant est aussi altérée. Ensuite se met en place une phase de réparation qui met en jeu une hyperplasie des pneumocytes de type II et une prolifération des fibroblastes ¹¹⁵.

II-2-6-c. Le diagnostic

Le diagnostic repose sur la présentation clinique et l'exclusion de l'œdème cardiogénique. On envisage un diagnostic d'ARDS si un patient a besoin d'une FiO₂ supérieure à 50% pour maintenir une saturation au-dessus de 92%. L'analyse des gaz

sanguins artériels révèle une hypoxémie sévère et réfractaire à l'oxygénothérapie. Le gradient alvéolo-artériel (A-a) est augmenté. La valeur du ratio PaO₂/FiO₂ sert à définir s'il s'agit de ALI ou ARDS (cf définition). On peut noter que si le ratio est inférieur à 200 on peut envisager un shunt intra-pulmonaire de plus de 20% du volume sanguin circulant ¹¹².

II-2-6-d. Le traitement

La prise en charge des patients atteints de ARDS doit être agressive et la surveillance des signes vitaux très attentive ¹¹². L'assistance ventilatoire doit être ajustée de façon à limiter les lésions pulmonaires en maintenant l'oxygénation du sang. L'utilisation d'un faible volume Tidal associé au maintien d'une pression positive en fin d'expiration (PEEP) est une solution. Un volume Tidal de 6 à 7 ml/kg est utilisé chez le nouveau-né en médecine humaine et donne lieu à une hypercapnie dite permissive de 55 à 70 mmHg. La PEEP, initialement de 2 à 4 cm d'eau, doit être ajustée de façon à maintenir la PaO₂ entre 55 et 80 mmHg avec une FiO₂ inférieure à 60%. S'il est nécessaire d'augmenter la PEEP au-delà de 15 cm d'eau, le retour veineux peut être diminué et limiter la post-charge cardiaque. Il convient alors d'utiliser des inotropes positifs et d'administrer une fluidothérapie. Les valeurs, au-delà desquelles les risques de volutrauma et de barotrauma sont importants, sont un volume Tidal supérieur à 10-15 ml/kg et une pression d'inspiration (PIP) supérieure à 30 cm d'eau.

Il convient également de résoudre la cause sous-jacente d'ALI ou ARDS et identifier l'origine de processus inflammatoire systémique.

II-3. L'exploration de la fonction respiratoire

II-3-1 Rappels anatomiques et physiologiques

II-3-1-a. La ventilation

Une fonction respiratoire efficace dépend d'une bonne ventilation. La ventilation pulmonaire est fonction de la fréquence des mouvements respiratoires (rpm) et leur amplitude. Le volume tidal (V_t) est le volume d'air mobilisé à chaque mouvement respiratoire : il dépend de l'amplitude du mouvement respiratoire. La fonction ventilatoire est évaluée par la «ventilation minute» ou V_m définie telle que : $V_m = V_t * rpm$. On parle d'hypoventilation quand V_m est diminuée ¹¹⁶.

La ventilation efficace pour l'animal est la ventilation alvéolaire. À chaque inspiration, le volume inspiré (V_t) remplit d'abord les voies respiratoires puis les alvéoles. Seul l'air contenu dans les alvéoles est utile aux échanges gazeux avec le sang (V_a). Le volume tidal se décompose en volume d'espace mort anatomique constitué par les voies respiratoires (V_d) et le volume alvéolaire (V_a) selon la formule : $V_t = V_d + V_a$. La ventilation alvéolaire minute (V_{ma}) est donc : $V_{ma} = (V_t - V_d) * rpm$. Une augmentation de l'espace mort (V_d), une diminution du volume tidal (V_t) et/ou une diminution fréquence respiratoire (rpm) vont diminuer la ventilation alvéolaire par conséquent diminuer l'efficacité de la respiration ¹¹⁶.

II-3-1-b. Les échanges gazeux

Les échanges gazeux sont efficaces dans une alvéole lorsqu'elle est à la fois ventilée et perfusée correctement. L'adéquation entre la perfusion et la ventilation d'une alvéole est illustrée par le rapport V_a/Q où V_a est la ventilation alvéolaire et Q la perfusion ou débit sanguin^{90,116}. Les échanges gazeux sont moins efficaces si ce rapport varie. Dans des conditions normales de perfusion et de ventilation, le V_a/Q est dit optimal et les échanges gazeux alvéolo-artériels sont considérés comme optimaux. Dans l'alvéole, la pression partielle en oxygène (ou PAO_2) est de 104 mmHg et la pression partielle en dioxyde de carbone (ou $PACO_2$) est de 40 mmHg si on considère un homme respirant au niveau de la mer¹¹⁶.

Les échanges gazeux à travers la membrane alvéolo-capillaire sont déterminés par la loi de Fick qui prend en compte: 1- l'épaisseur de la membrane, 2- la surface d'échange, 3- le coefficient de diffusion du gaz (caractéristique intrinsèque au gaz) et 4- le gradient alvéolo-capillaire¹¹⁶.

La membrane alvéolo-artérielle est composée de 6 couches : un film liquide tapissant l'alvéole et contenant entre autres le surfactant, la couche de pneumocytes I, la membrane basale de l'épithélium pulmonaire, un espace interstitiel très mince, la membrane basale capillaire, et l'endothélium du capillaire⁹⁰. L'épaisseur de la membrane peut être augmentée en cas d'œdème pulmonaire ou interstitiel, de fibrose de l'épithélium pulmonaire ou en cas d'épaississement de la paroi endothéliale. La surface peut être diminuée en cas d'emphysème pulmonaire. Le coefficient de diffusion est caractéristique du gaz et dépend notamment de son poids moléculaire :

le CO₂ diffuse 20 fois plus vite que l'O₂⁹⁰. Enfin le gradient de pression alvéolo-capillaire dépend à la fois de la ventilation de l'alvéole et de la sa perfusion. Il diminue dès que le Va/Q est modifié par rapport à sa normale.

II-3-2. Paramètres cliniques

II-3-2-a. Fréquence respiratoire et qualité de la respiration

La fréquence respiratoire normale chez un veau nouveau-né est de 48 rpm (30-60)¹¹⁷. La respiration est qualifiée de dyspnéique si elle est difficile ou laborieuse. Les signes de dyspnée chez le bovin incluent une respiration haletante, une augmentation de la fréquence respiratoire, une extension de la tête et du cou comme si l'animal cherchait son air, une respiration par la bouche, des mouvements abdominaux et intercostaux exagérés, une expiration en deux temps, des sifflements et dans les cas extrêmes de la cyanose¹¹⁸. La tachypnée est définie par une augmentation de la fréquence respiratoire. Elle peut être associée ou non avec de la dyspnée, lors d'un défaut d'oxygénation du sang, d'une compensation d'acidose métabolique, dans un environnement très chaud, lors d'une lésion du système nerveux central, d'une atteinte des muscles respiratoires et/ou des motoneurones associés, et de douleur. La bradypnée est définie par une diminution de la fréquence respiratoire. Elle peut être observée en phase terminale de maladies débilitantes, lors d'atteinte du système nerveux central, lors d'atteinte du système nerveux périphérique ou de la plaque motrice (botulisme par exemple), ou de déséquilibres électrolytiques

¹¹⁸.

II-3-2-b. Auscultation

À l'auscultation, les bruits respiratoires normaux correspondent au passage de l'air dans le tractus respiratoire. Ils sont plus facilement audibles chez le veau que chez le bovin adulte à cause de l'épaisseur de la musculature intercostale et du tissu adipeux¹¹⁹. Les bruits respiratoires peuvent être augmentés ou diminués, et des bruits surajoutés peuvent être présents. Les bruits respiratoires sont augmentés lors de dyspnée et d'emphysème. Ils seront diminués lors d'épanchement pleural. Des crépitements peuvent être entendus lors de l'auscultation principalement à l'inspiration. L'origine du bruit vient de l'expansion soudaine d'alvéoles collapsées. Les crépitements sont principalement associés à une infection ou l'inflammation des bronchioles et alvéoles. Ils peuvent être aussi associés à de l'œdème des poumons¹¹⁹. Des sifflements peuvent également être audibles et résultent du rétrécissement des voies respiratoires qui entraîne une accélération et de la turbulence dans le flux d'air (bronchoconstriction ou obstruction partielle par des sécrétions).

II-3-2-c. Examen des muqueuses – détection de la cyanose

La cyanose est une coloration bleue des muqueuses due à l'abondance de désoxyhémoglobine dans le sang circulant. Elle apparaît à partir de 50 mg/L de désoxyhémoglobine)¹²⁰. Chez le veau nouveau-né, la cyanose peut être tardive par rapport à l'installation de l'hypoxémie, notamment parce que lors de la naissance, il subit une vasoconstriction périphérique. La PaO₂ peut diminuer jusqu'en dessous de

35-40 mmHg avant que n'apparaisse la cyanose ¹²⁰. La cyanose est un indicateur de l'hypoxémie avec une bonne valeur prédictive positive.

II-3-2-d. Les analyses de laboratoires

L'analyse des gaz sanguins

L'analyse des gaz sanguins reflète la qualité des échanges gazeux entre les alvéoles et les artérioles pulmonaires. Elle se fait préférentiellement sur du sang artériel. L'analyse des gaz sanguins veineux est informative en ce qui concerne le pH et la PCO₂ mais la PO₂ ne peut pas être interprétée.

Chez le veau, du sang artériel peut être obtenu assez facilement de l'artère brachiale ^{121,122}, de l'artère auriculaire caudale ^{95,122-124} et de l'artère fémorale entre autres ^{121,122}. Les deux premières ont été utilisées pour recueillir des échantillons sanguins à répétition ^{121,123} et semblent les plus accessibles pour poser un cathéter. Les valeurs de référence pour les valeurs des gaz sanguins artériels chez le veau nouveau-né sont peu nombreuses dans la littérature.

Adams et al. ¹²⁵ rapportent les résultats d'une étude comparant les différences physiologiques entre veaux singletons et veaux jumeaux. Les veaux singletons peuvent être considérés comme des veaux normaux (n=30, 14 femelles et 16 mâles). Les veaux étaient de race Angus, Hereford ou croisés et d'un poids moyen de 33,1 +/- 3,6 kg. Cependant les conditions de naissance ne sont pas les mêmes pour tous les veaux : vêlage avec ou sans assistance, mais ils sont tous nés naturellement. De plus,

ces veaux sont nés et ont été examinés à 1524 m d'altitude (Colorado) d'où une $P_{atm}O_2$ (pression atmosphérique en oxygène) plus faible qu'au niveau de la mer. Les échantillons ont été prélevés par ponctions répétées de l'artère brachiale et les valeurs observées étaient les suivantes (moyenne +/-écart-type):

Tableau V : Valeurs des gaz sanguins artériels obtenus des veaux nouveau-nés à 1524m d'altitude (n=30), d'après Adams, 1993

<i>Âge</i>	<i>pH</i>	<i>PaO₂ (mmHg)</i>	<i>PaCO₂ (mmHg)</i>	<i>HCO₃⁻ (mmol/l)</i>
1h	7,30 (+/-0,05)	58,4 (+/-11,6)	50,4 (+/-5,3)	23,5 (+/-2,8)
4h	7,34 (+/-0,03)	62,3 (+/-9,3)	47,9 (+/-4,0)	24,5 (+/-2,3)
12h	7,38 (+/-0,03)	67,2 (+/-9,3)	45,4 (+/-4,0)	25,7 (+/-2,4)
24h	7,40 (+/-0,03)	70,5 (+/-11,5)	44,0 (+/-3,4)	26,4 (+/-1,9)
48	7,42 (+/-0,02)	63,8 (+/-10,8)	45,2 (+/-3,7)	28,0 (+/-1,9)

Varga et al. (1999) ¹²⁶ ont également publié des valeurs obtenues chez 12 veaux de race Holstein (7 mâles et 5 femelles) nés à terme de façon naturelle. Les prélèvements de sang artériel ont été faits par ponction de l'artère brachiale comme décrit par Adams (1991). Des échantillons ont été obtenus dans les 2 minutes, 6 heures et 24 heures après la naissance. Les paramètres analysés ont été le pH, les pressions partielles en O₂ et CO₂, l'excès de base, le taux de bicarbonates, et la saturation en oxygène de l'hémoglobine. Les résultats sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI : Valeurs des gaz sanguins artériels obtenus des veaux nouveau-nés (n=12), d'après Varga, 1999

<i>Age</i>	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	SatO ₂ %
<i>2 min</i>	7,26 (+/- 0,03)	45,2 (+/- 16,8)	59,8 (+/- 3,9)	24,9 (+/- 2,8)	60 (+/-20,9)
<i>6h</i>	7,35 (+/- 0,04)	68,4 (+/- 15,5)	50,4 (+/- 4)	26,7 (+/-1,6)	88,2 (+/- 8,3)
<i>24h</i>	7,39 (+/- 0,04)	78,8 (+/- 15,7)	46,4 (+/- 3,9)	26,7 (+/- 1,9)	92,7 (+/- 3,5)

L'évolution des gaz sanguins a été publiée par Bleul et al. 2007¹²³. Cinquante-sept veaux sont entrés dans l'étude (39 Suisse Brune, 15 Simmental et 3 Holstein). Leurs valeurs de gaz sanguins artériels et veineux ont été suivies à 2 et 30 minutes, et 4, 12 et 24 heures après la naissance. Les résultats des gaz artériels sont présentés ci-dessous.

Tableau VII : Valeurs des gaz sanguins artériels obtenus des veaux nouveau-nés (n=57), d'après Bleul, 2007

<i>Âge</i>	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)
<i>2 min</i>	7,30 (+/-0,06)	45.3 (+/-16,0)	57.3 (+/-5.0)	27.8 (+/-3.4)
<i>30 min</i>	7,36 (+/-0,04)	58.1 (+/-13.1)	52.6 (+/-5.0)	28.0 (+/-2.4)
<i>4h</i>	7,38 (+/-0,03)	67,7 (+/-14.5)	48.7 (+/-3.7)	27.4 (+/-2.3)
<i>12h</i>	7,42 (+/-0,03)	71.9 (+/-8.3)	43.7 (+/-4.7)	27.0 (+/-2,9)
<i>24h</i>	7,43 (+/-0,04)	66.8 (+/-14.2)	44,2 (+/-4.3)	28.3 (+/-3.3)

La PaO₂

La pression partielle en oxygène est généralement exprimée en mmHg. L'analyse de la PaO₂ doit être faite sur un échantillon maintenu en stricte anaérobiose

et dans un délai assez rapide après le prélèvement (dans les 15 minutes d'après la notice de l'appareil à gaz sanguin). Si ce n'est pas le cas, la PaO₂ sera surestimée du fait que le sang se sera enrichi en oxygène au contact de l'atmosphère qui en contient plus (au niveau de la mer la pression atmosphérique en oxygène est environ de 150mmHg).

Au niveau de la mer et chez une vache adulte en bonne santé, la PaO₂ est de 103mmHg dans l'artère brachiale et de 93mmHg dans l'artère auriculaire caudale. La différence est significative statistiquement ¹²².

La PaO₂ reflète l'efficacité des échanges gazeux aux poumons. Elle représente l'oxygène dissout dans le sang, qui représente 3% du contenu sanguin en oxygène. Le reste de l'oxygène est fixé sur l'hémoglobine. Il s'agit d'un bon indicateur de la fonction respiratoire mais pas du contenu sanguin en O₂ qui est l'oxygène disponible pour les tissus. Un animal peut donc être hypoxémique mais pas hypoxique si son contenu en oxygène est encore suffisant (une quantité d'hémoglobine normale ou élevée) et que la distribution est efficace (débit sanguin et vascularisation normaux). *A contrario*, un animal peut être hypoxique même avec une PaO₂ normale si sa quantité d'hémoglobine diminue (anémie sévère ou hémorragie) ou si la distribution en O₂ est compromise (choc hypovolémique, septique ou cardiogénique par exemple).

L'hypoxémie est définie par une PaO₂ < 85 mmHg chez un bovin adulte respirant l'air ambiant ¹²⁰. Cependant chez le veau nouveau-né, les 3 études citées ci-

dessus rapportent des valeurs de PaO₂ augmentant de 45 et 72 mmHg entre 2 min et 24 h d'âge. On voit donc que les veaux nouveau-nés ont des valeurs de PaO₂ inférieure aux adultes : soit les veaux sont hypoxémiques à la naissance et leur PaO₂ augmente avec le temps tandis que ses échanges gazeux s'améliorent, soit la valeur limite pour dire d'un veau qu'il est hypoxémique devrait être plus basse (60 mmHg pour un veau de 24h par exemple).

Tableau VIII : Valeurs des PaO₂ chez des veaux nouveau-nés entre la naissance et 48h d'âge d'après 3 études ^{123,125,126}

Âge	Adams ¹²⁵	Varga ¹²⁶	Bleul ¹²³	Moyenne d'après les 3 études
2 min		45,2 (+/- 16,8)	45,3 (+/-16,0)	45
30 min	58,4 (+/-11,6)		58,1 (+/-13,1)	58
4h	62,3 (+/-9,3)	68,4 (+/- 15,5)	67,7 (+/-14,5)	65
12h	67,2 (+/-9,3)		71,9 (+/-8,3)	69
24h	70,5 (+/-11,5)	78,8 (+/- 15,7)	66,8 (+/-14,2)	72

Les principales causes d'hypoxémie sont ⁹⁰ : i)- une diminution de la pression partielle en oxygène (altitude), ii)- une diminution de la capacité de diffusion de l'O₂ à travers la membrane alvéolo-capillaire (fibrose, œdème, emphysème), iii)- une hypoventilation mécanique (lésion musculaire ou squelettique de la cage thoracique, lésion du système nerveux central, perte de compliance pulmonaire, épanchement pleural), iv)- une hypoventilation fonctionnelle (atélectasie, œdème pulmonaire), v)- une anomalie du rapport ventilation/perfusion (dont les extrêmes sont une

hypoventilation fonctionnelle complète, et un shunt droite / gauche complet) et vi)- un shunt de la circulation pulmonaire (persistance de la circulation fœtale).

Lorsque l'hypoxémie est sévère, elle entraîne de l'hypoxie. L'hypoxie est un défaut d'oxygène à l'échelle cellulaire qui empêche la production d'ATP par la voie aérobie mitochondriale (cycle de Krebs) ⁹⁰.

La SatO2

Quatre-vingt-dix-sept pourcent du contenu sanguin en oxygène est fixé sur l'hémoglobine ⁹⁰. La saturation en oxygène est donc un indicateur de la quantité d'oxygène disponible pour les cellules. Cependant la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine n'est pas linéaire mais sigmoïde. Ainsi il faut qu'il y ait une forte diminution de la pression partielle en oxygène pour voir une diminution de la saturation en oxygène ⁹⁰. La saturation est donc un indicateur de l'efficacité des échanges respiratoires moins sensible que la PaO2. De plus, lorsque l'on supplémente un individu en oxygène, la saturation en oxygène n'est pas un bon paramètre pour suivre la fonction respiratoire parce qu'on se retrouve dans la partie asymptotique de la courbe, là où on observe des variations importante de PaO2 et des très petites variations de la SatO2.

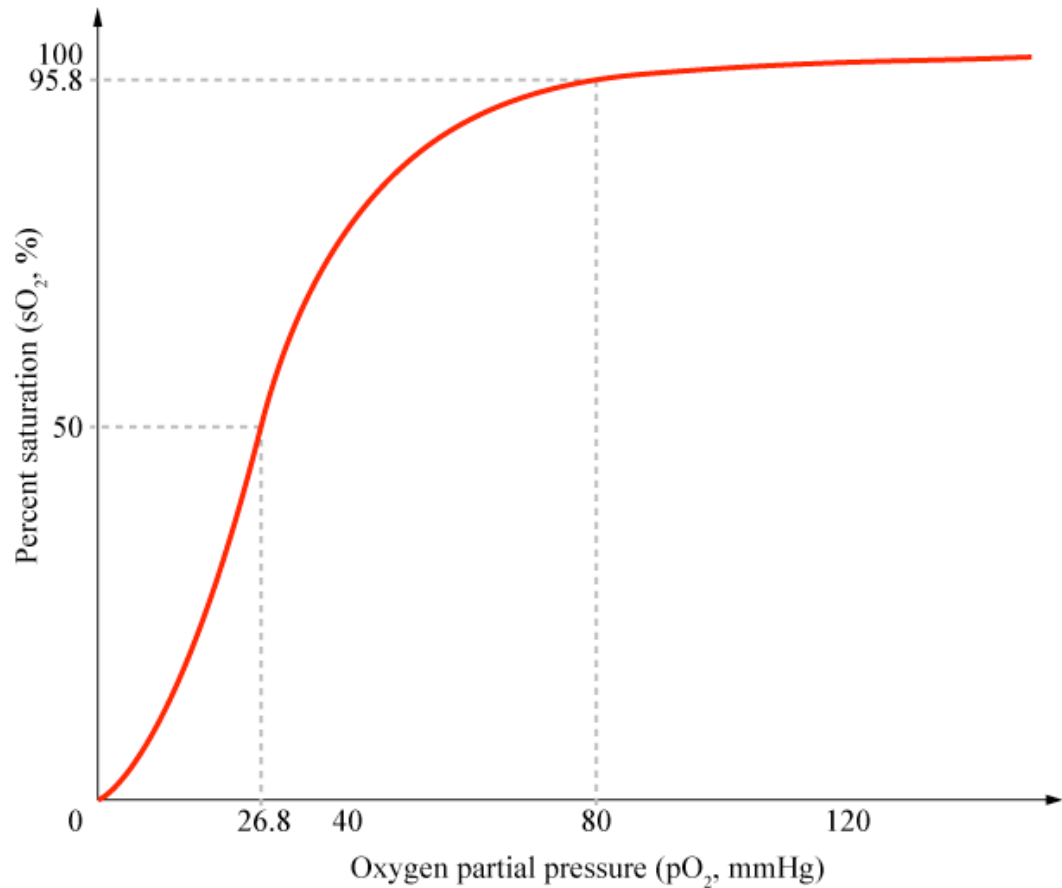


Figure 5 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine d'après ⁹⁰

La PaCO₂

La pression partielle en CO₂ est généralement exprimée en mmHg. Elle dépend de la capacité des poumons à éliminer le CO₂, déchet de la production d'énergie par les cellules ⁹⁰. L'analyse doit également être faite sur un échantillon maintenu en stricte anaérobiose. Si ce n'est pas le cas, la PaCO₂ sera sous-évaluée car le sang se sera appauvri en CO₂ au contact de l'air ambiant qui en est très pauvre.

Au niveau de la mer et chez bovin adulte en bonne santé, la PaCO₂ est 36,8 mmHg en moyenne dans l'artère brachiale et 38,2 mmHg dans l'artère auriculaire caudale ¹²².

L'hypocapnie est définie par une PaCO₂ < 35 mmHg ¹²⁰. Elle est associée à de l'hyperventilation et provoque un état d'alcalose respiratoire. L'hyperventilation est souvent un mécanisme de compensation par exemple pour contrôler une acidose métabolique, un choc, une hypoxémie ou une hyperthermie. Elle peut également être consécutive à une augmentation des besoins en oxygène au cours d'un exercice ou de septicémie. Enfin l'hyperventilation peut se manifester en cas de peur, de douleur ou de stress ¹²⁰. L'hypercapnie est associée à un défaut d'élimination du CO₂ par la fonction pulmonaire. Elle est définie par une PaCO₂>55mmHg ¹²⁰. Elle est associée à de l'hypoventilation et provoque un état d'acidose respiratoire. Les causes d'hypocapnie peuvent être une maladie pulmonaire, une lésion structurale de la cavité thoracique, une dépression du système nerveux central, un pneumothorax, une effusion pleurale ou une ventilation mécanique inadaptée ⁹⁰. Cependant la capacité de diffusion de CO₂ est 20 fois supérieure à celle de l'O₂. De fait, la PaCO₂ est rarement affectée par les anomalies de ventilation/perfusion et de diffusion. Elle est généralement considérée comme le reflet de l'efficacité de la ventilation ⁹⁰.

Le gradient alvéolo-artériel ou (A-a)

Le gradient alvéolo-artériel est la différence entre la pression partielle en oxygène dans l'alvéole (PAO₂) et celle dans le sang artériel (PaO₂) : A-a = PAO₂-

PaO₂. Il reflète la qualité des échanges gazeux entre l'alvéole et le sang capillaire. Un gradient A-a normal exclut l'hypoventilation comme cause des modifications de la PaO₂. Le gradient A-a peut être calculé à partir de la valeur des gaz sanguins selon la formule suivante ¹¹⁶ : $PAO_2 = (P_{atm} - 42) * FiO_2 - (PaCO_2 / 0.8)$ où P_{atm} est la pression atmosphérique soit 760 mmHg au niveau de la mer, 42 mmHg est la pression de vapeur d'eau saturante, FiO_2 est la fraction inspirée d'oxygène en pourcentage soit 0,21 dans l'air ambiant, et 0,8 est une constante caractérisant les échanges respiratoires. De façon simplifiée, dans l'air ambiant et au niveau de la mer cela donne (West JB, 1990) : $A-a = (150 - PaCO_2 / 0,8) - PaO_2$

Une application numérique pour un bovin adulte respirant l'air ambiant au niveau de la mer donnerait : $A-a = (150 - 38,2 / 0,8) - 93 = 9,25$, si on utilise les valeurs obtenues à partir d'un échantillon prélevé dans l'artère auriculaire caudale ¹²². Chez un veau de 24h d'âge ¹²³ le A-a serait de $(150 - 44,2 / 0,8) - 66,8 = 28$.

Pour un individu adulte en bonne santé, le A-a est généralement compris entre 4 et 10 mmHg chez les grands animaux ¹²⁰. Une augmentation du A-a est associée à une anomalie des échanges de gaz respiratoires dans les poumons. Le plus fréquemment il s'agit d'une anomalie de ventilation/perfusion. Une valeur du A-a supérieure à 10 chez le veau à 24h d'âge pourrait s'expliquer par la présence résiduelle de fluide pulmonaire, par la persistance de la circulation fœtale, ou encore par une atélectasie néonatale.

A noter que le gradient A-a peut également être calculé chez l'homme sous 100% d'oxygène ¹²⁷. Après 20 à 30 minutes de traitement, on peut considérer que le gaz alvéolaire est constitué par 100% d'oxygène. Alors on remplace 150 mmHg par 713 mmHg ($P_{atm} = 760 \text{ mmHg} - 47 \text{ mmHg}$, la pression de vapeur d'eau saturante). Si le gradient A-a est supérieur à 100-125 mmHg sous 100% d'oxygène, il existe une anomalie de ventilation/perfusion ¹²⁷. La valeur du gradient A-a varie selon la fraction inspirée d'oxygène et des valeurs normales en fonction de la F_iO_2 inspirée n'ont été établies que chez l'homme.

Le ratio PaO_2/F_iO_2

Lorsqu'un individu est supplémenté en oxygène, la PaO_2 et la $SatO_2$ sont des mauvais indicateurs de la fonction respiratoire. En effet d'après la loi de Fick, la PaO_2 est augmentée quand la F_iO_2 augmente ¹¹⁶. Il faudrait toujours comparer la valeur de la PaO_2 mesurée avec une valeur attendue pour une F_iO_2 donnée. Le ratio PaO_2/F_iO_2 a donc été utilisé en médecine humaine pour évaluer la sévérité des anomalies des échanges gazeux ¹¹³.

Pour un bovin adulte en bonne santé respirant l'air ambiant au niveau de la mer, le ratio PaO_2/F_iO_2 que l'on peut calculer serait de : $93/0,21=443$. En médecine humaine, un ratio inférieur à 300 caractérise un ALI (Acute Lung Injury), et un ratio inférieur à 200 caractérise un ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) c'est à dire que la maladie respiratoire affecte sévèrement et très sévèrement les échanges gazeux respiratoires.

Le lactate

L'hypoxémie peut entraîner une hypoxie cellulaire. Cependant, les cellules continuent à fonctionner et ont besoin d'énergie. Elles s'orientent alors vers un métabolisme anaérobie, et n'utilisent que la glycolyse pour générer de l'ATP⁹⁰. Chaque glucose donne deux pyruvates qui sont ensuite fermentés en L-lactate qui s'accumule dans la cellule puis dans le sang⁹⁰. Le lactate est un produit terminal qui n'inhibe pas la glycolyse, celle-ci peut donc se maintenir et continuer à produire l'ATP nécessaire au fonctionnement de la cellule.

Le lactate est généralement métabolisé par le foie (60-70%) et le rein (20-30%) pour donner du pyruvate qui participe à la néoglucogénèse ou entre dans le cycle de Krebs pour produire de l'ATP¹²⁸. Il peut également être utilisé par les cellules cardiaques⁹⁰ pour donner de l'énergie. Cependant s'il est produit en trop grande quantité il s'accumule dans le sang. L'accumulation du L-lactate dans le sang est donc un signe indirect d'hypoxie cellulaire et plus la concentration de lactate est élevée, plus l'hypoxie est importante et/ou dure depuis longtemps. Une augmentation de la lactatémie traduit une persistance de l'hypoxie tandis qu'une diminution est plutôt associée à une amélioration de l'apport et de l'utilisation de l'oxygène par les cellules.

La naissance est un stress important pour le nouveau-né, généralement associée à une situation d'hypoxie passagère. La lactatémie chez les veaux nouveau-

nés est comprise entre 1,5 et 4 mmol/L ⁹⁵ et elle est plus élevée chez les animaux présentant une acidémie (pH<7,2) ⁹⁵.

L'état acido-basique

L'analyse des gaz du sang est généralement associée à une évaluation du profil acido-basique à l'aide du pH, de la concentration plasmatique en bicarbonates et de la PaCO₂.

La valeur normale du pH chez les bovins se situe entre 7,31 et 7,53 ¹²⁹. Une valeur de pH inférieure à 7,31 est une acidémie, tandis qu'une augmentation au-dessus de 7,53 est une alcalémie. Chacun de ces états peut résulter d'un mécanisme d'origine respiratoire ou métabolique. Le mécanisme responsable de la modification du pH est appelé alcalose ou acidose.

Les gaz du sang veineux

La PvO₂ varie en fonction des échanges gazeux respiratoires mais aussi en fonction de l'utilisation de l'oxygène disponible par les cellules. Elle n'est généralement pas un bon paramètre d'évaluation de la fonction respiratoire.

Chez le veau en santé, les paramètres veineux d'évaluation du statut acido-basique, tels que la PCO₂, le pH, et la concentration plasmatique en bicarbonates, sont fortement corrélés avec les paramètres artériels ¹³⁰. Ainsi il est concevable, en l'absence d'accès à une voie artérielle, d'évaluer le statut acido-basique à partir de

valeurs veineuses, si l'échantillon analysé a été prélevé et conservé en conditions anaérobiques strictes.

II-3-2-e. Radiographie thoracique

En médecine humaine, l'utilisation de la radiographie thoracique permet non seulement d'évaluer l'étendue des lésions pulmonaires mais aussi dans certains cas, tels l'aspiration de méconium ou la maladie des membranes hyalines, d'émettre un diagnostic en présence d'images caractéristiques⁸⁹. Chez les grands animaux, peu de références chez le nouveau-né sont disponibles. Peu de temps après la naissance, on peut distinguer l'aorte, la veine cave caudale et la silhouette cardiaque, ainsi que le champ pulmonaire¹³¹. En cas de lésions pulmonaires, on peut apprécier le type d'infiltration, la sévérité et la localisation de lésions, mais il est impossible de différencier des lésions de pneumonie bactérienne de celle d'atélectasie ou de d'œdème pulmonaire¹³¹.

La radiographie est également un outil de suivi clinique. Elle permet de suivre l'évolution (aggravation ou amélioration) des lésions en conjonction avec celles des paramètres physiques. Chez les grands animaux, les radiographies thoraciques sont réalisées debout pour les adultes et peuvent être réalisées debout ou en (décubitus sternal, dorsale ou latéral) chez les jeunes notamment les animaux anesthésiés, comateux ou fortement débilités¹³¹.

II-4. Support de la fonction respiratoire

L'insuffisance respiratoire aigue apparaît quand la fonction respiratoire est incapable de maintenir une oxygénation du sang artériel suffisante pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme. Les caractéristiques des gaz du sang qui définissent la défaillance respiratoire aigue en pédiatrie humaine sont : $PaO_2 < 50$ mmHg, $PaCO_2 > 50$ mmHg et un $pH < 7,35$ ¹²⁷. L'hypoxémie peut avoir plusieurs origines et il convient de l'identifier afin d'adapter le traitement au mieux.

II-4-1. Oxygénothérapie

II-4-1-a. Indications

L'oxygénothérapie est indiquée pour traiter l'hypoxémie résultante des situations suivantes ⁹⁰ : les hypoxémies d'origine atmosphérique (la diminution de la $P_{atm}O_2$ en altitude), les hypoxémies de suffocation (diminution de la F_{iO_2} dans un espace clos non ventilé), les hypoxémies d'origine diffusionnelle (emphysème pulmonaire, œdème pulmonaire, fibrose pulmonaire) et dans une certaine mesure lors d'inadéquation ventilation/perfusion ¹³².

Hypoxémie atmosphérique

Il s'agit d'une diminution de la PaO_2 due à la diminution de la $P_{atm}O_2$ et par conséquent de la PAO_2 . En effet, les échanges gazeux à travers la membrane alvéolo-capillaire sont régis par la loi de Fick dont une des composantes est le gradient de pression du gaz entre les deux compartiments concernés ¹¹⁶. Une diminution de la

PAO₂ diminue ce gradient et donc la PaO₂. Il ne s'agit pas d'un problème fonctionnel. L'hypoxémie atmosphérique est une situation où l'oxygénothérapie est indiquée. L'apport d'O₂ supplémentaire permet d'augmenter la FiO₂, et par conséquent la PAO₂ et la PaO₂. L'oxygénothérapie est dans ce cas un traitement curatif étiologique en attendant le rétablissement d'une PatmO₂ correcte (redescente à une altitude moindre).

Hypoxémie de suffocation

Il s'agit d'une diminution de la PaO₂ suite à une diminution de la FiO₂ disponible dans l'air respiré. Cette situation est rare, notamment en médecine vétérinaire. Elle est observée lorsqu'un individu est enfermé dans un espace clos dont l'air n'est pas renouvelé. Au fur et à mesure que l'individu va respirer, il va consommer l'oxygène disponible et produire du dioxyde de carbone. Cela aura pour effet d'augmenter le pourcentage de CO₂ et de diminuer le pourcentage d'O₂ dans l'air. Ainsi l'individu respirera un air de moins en moins riche en oxygène (diminution de la FiO₂) ce qui aura pour effet de diminuer la PAO₂ et le gradient d'oxygène en l'alvéole et l'artériole. Cette diminution d'une des composantes de la loi de Fick provoque une diminution de la PaO₂. L'oxygénothérapie est dans ce cas un traitement curatif.

Hypoxémie diffusionnelle

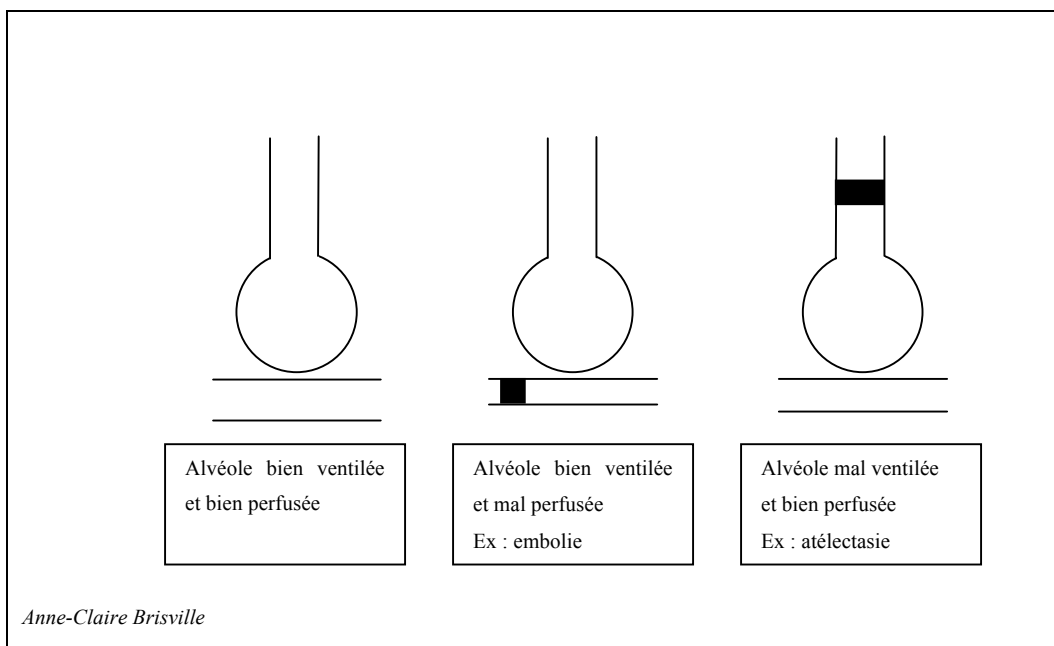
Il s'agit d'une diminution de la diffusion de l'O₂ à travers la membrane alvéolo-capillaire à cause d'une augmentation de l'épaisseur de la membrane (fibrose

pulmonaire ou inflammation) ou d'une diminution de la surface d'échange (emphysème pulmonaire). L'apport supplémentaire d'oxygène permet d'augmenter la PAO₂. Le gradient entre l'alvéole et le capillaire permet une augmentation de la vitesse de diffusion de l'oxygène et une augmentation de la PaO₂¹³². Il s'agit d'un traitement de soutien.

Hypoxémie d'inadéquation de ventilation/perfusion

Dans les anomalies de ventilation/perfusion (ou V/Q mismatch), la diminution de la PaO₂ peut être due soit à une diminution de la ventilation alvéolaire qui a pour effet de diminuer la PAO₂, soit à la diminution de la perfusion alvéolaire qui empêche l'oxygène alvéolaire de passer dans le sang, soit à une association des deux situations.

Figure 6 : Exemple d'anomalies de ventilation/perfusion



Dans les cas d'anomalies de ventilation/perfusion, la supplémentation en oxygène permet d'augmenter la PAO₂ dans les alvéoles même si elles sont mal ventilées. Cela permet de corriger partiellement la PaO₂¹³². Cependant l'oxygénothérapie n'aura aucun effet sur l'hypoventilation et l'augmentation de la PaCO₂ qui y est associée. De plus, lors de V/Q mismatch, toutes les alvéoles ne sont pas dans la même situation. Augmenter la FiO₂ permet d'augmenter la quantité d'oxygène qui parvient dans les alvéoles fonctionnelles. L'oxygénothérapie est un traitement de soutien et non un traitement curatif. Elle permet de maintenir une PaO₂ et un apport d'oxygène aux cellules minimal le temps de rétablir l'adéquation entre la ventilation et la perfusion. L'oxygénothérapie peut être efficace pour rétablir la PaO₂ dans les cas où la ventilation est altérée. Cependant elle n'aura aucun effet dans les cas où c'est la perfusion qui est altérée¹³².

II-4-1-b. Objectifs de traitement

Recommandations d'intervention

L'oxygénothérapie est généralement instaurée en présence de signes évidents d'hypoxémie telle que la cyanose ou la détresse respiratoire. L'hypoxémie peut être confirmée par une analyse des gaz artériels. En pédiatrie humaine, la limite d'intervention est une PaO₂ inférieure à 50-60 mmHg ou une SatO₂ inférieure à 90% si l'enfant respire l'air ambiant¹²⁷. En néonatalogie équine, des valeurs de PaO₂ inférieure à 60 mmHg ou de SatO₂ inférieure à 90% ont été utilisées comme limites

pour l'instauration d'oxygénothérapie ⁹⁷. Chez le veau, la valeur de 50 mmHg a été utilisée comme limite d'instauration de l'oxygénothérapie ¹³³. Cependant il s'agit de rapport de cas et aucun consensus n'existe.

Toxicité de l'oxygène

Un environnement pulmonaire maintenu très riche en O₂ pendant plusieurs jours est préjudiciable à la fonction respiratoire ^{132,134}. La toxicité de l'oxygène est triple. D'une part, la présence d'une forte concentration d'oxygène dans les alvéoles accélère la production de radicaux libres oxygénés tels que les superoxydes (O₂⁻) et les peroxydes (H₂O₂) ¹³⁴. Ces radicaux sont généralement pris en charge par des catalases et des superoxydes dismutases mais une augmentation de leur production excède la capacité anti-oxydante du poumon. Ils causent alors des microlésions vasculaires qui entraînent l'apparition d'œdème pulmonaire et altèrent la fonction du surfactant. Le tableau clinique qui s'ensuit peut être similaire à celui d'ARDS ¹³⁴.

D'autre part, l'apport de 100% d'oxygène est responsable, à terme, de l'apparition d'atélectasie d'absorption ¹³⁴. En effet, l'oxygène remplace peu à peu l'azote alvéolaire et, en présence d'hypoventilation, même de faible degré, la consommation progressive de l'oxygène entraîne à l'atélectasie. Il est admis à l'heure actuelle, qu'il faut limiter au maximum la FiO₂, et la durée de traitement au-delà de avec une FiO₂ supérieure à 50 %. Les limites suivantes ont été recommandées en médecine humaine : pas plus de 6h sous 100% d'oxygène et pas plus de 24h sous 70% d'oxygène ¹³⁵. Au-delà de 24h, il est préférable de maintenir la FiO₂ inférieure à

50 %¹²⁷. Le but est d'administrer la plus faible FiO₂ nécessaire pour corriger l'hypoxémie.

Une illustration numérique pour un poulain de 40 kg recevant 2 x 15L d'O₂/min, soit 375 ml/kg/min/canule donne la valeur de FiO₂ suivante :

$$FiO_2 = 17,33 + (0,2665 \times \text{débit d'oxygène en ml/kg/min/canule})$$

$$FiO_2 > 100\%$$

Avec la même équation, à partir de 310 ml / kg /min/canule, soit 15L/min, la FiO₂ reçue par le poulain est de 100%.

Enfin, l'administration d'oxygène peut être à l'origine d'une hypoventilation. En effet, lorsque la respiration est normale chez un individu, c'est la PaCO₂ qui est le principal paramètre de contrôle de la ventilation pulmonaire¹¹⁶. Une augmentation de la PaCO₂ aura pour effet d'accélérer la fréquence respiratoire tandis qu'une diminution la ralentira. Si la PaCO₂ est normale, ce n'est qu'en dessous de 50 mmHg que la PaO₂ entraîne l'accélération de la fréquence respiratoire. Cependant, en situation d'hypercapnie chronique (PaCO₂>50 mmHg chez l'homme adulte pendant plus d'1 jour ou 2⁹⁰), l'augmentation de la PaCO₂ n'est plus un stimulus efficace du contrôle de la ventilation. Alors, une PaO₂ inférieure à 100 mmHg est responsable d'une accélération de la fréquence respiratoire dans l'espèce humaine qui est plus marquée en dessous de 60mmHg^{90,116}. Ainsi lorsqu'un patient est en situation d'hypercapnie chronique et hypoxémique, si on augmente brusquement la PaO₂ en

apportant de l'oxygène, on risque de supprimer le stimulus hypoxémique et on provoque une hypoventilation qui peut aggraver l'hypercapnie préexistante. Il convient donc de limiter la FiO₂ afin d'augmenter modérément la PaO₂ de 10 à 20 mmHg¹²⁷.

Objectifs

Les objectifs de traitement par l'oxygène sont de soutenir la PaO₂ tout en évitant l'apparition de lésions pulmonaires supplémentaires. Les recommandations en pédiatrie humaine sont de maintenir la PaO₂ entre 70 et 90mmHg¹²⁷. Chez le poulain, les recommandations sont de maintenir la PaO₂ entre 80 et 110mmHg⁹⁷. Aucune recommandation n'a été établie chez le veau.

II-4-1-c. Modalités

Différents systèmes, qui permettent d'augmenter la FiO₂, sont utilisés en médecine humaine. On peut citer par exemple la canule intranasale, le masque ou la tente à oxygène¹²⁷. Il existe très peu de publications abordant l'administration d'oxygène supplémentaire chez les grands animaux nouveau-nés. Palmer détaille le soutien de la fonction respiratoire chez le poulain sévèrement malade⁹⁷. La technique habituelle pour administrer de l'oxygène est la canule intranasale. Il s'agit d'un tube en plastique souple percé de un ou plusieurs orifices, que l'on installe dans la cavité nasale en passant par la narine. La canule est généralement fixée sur le bord latéral de la narine à l'aide d'un ou 2 points de suture. Il est également possible de fixer la canule sur un licou. Il est important d'apporter de l'oxygène humidifié afin de ne pas

dessécher le tractus respiratoire. Le débit est ajusté en fonction de l'analyse des gaz sanguins artériels ⁹⁷. Il est possible de faire varier le débit de 1 à 15L par ligne avec les débitmètres couramment utilisés.

II-4-2. Assistance respiratoire mécanique

II-4-2-a. Indications

L'assistance ventilatoire mécanique est indiquée lorsque l'administration d'oxygène par voie intranasale ne suffit pas à maintenir une PaO₂ répondant aux objectifs précédents ou lorsque l'animal n'est pas capable de se ventiler correctement et d'éliminer le CO₂ ⁸⁹.

Hypoventilation

L'hypoventilation alvéolaire est associée à une augmentation de la PaCO₂ et à une diminution de la PaO₂. En médecine humaine, une PaCO₂ de 60 mmHg associée à un pH inférieur à 7,2 est considérée comme une indication de ventilation mécanique ⁸⁹. Cette condition est observée chez le nouveau-né lors de syndrome de détresse respiratoire néonatale, d'hypertension pulmonaire persistante, et en cours d'évolution d'ARDS et de pneumonie ⁸⁹. Elle peut également avoir des causes extra-pulmonaires comme une extrême faiblesse musculaire, des fractures costales, un épanchement pleural, une atteinte nerveuse centrale ou le botulisme.

Hypoxémie persistante

Certaines affections, qui provoquent de l'hypoxémie, ne répondent pas à l'oxygénothérapie. L'hypertension pulmonaire persistante en est un exemple. En pédiatrie humaine, la valeur critique pour l'indication de la ventilation mécanique est une PaO₂ inférieure à 50 mmHg malgré une FiO₂ entre 70 à 100%⁸⁹.

Apnée

Il est également évident que la ventilation mécanique est indiquée en cas d'apnée primitive⁹⁷.

II-4-2-b. Objectifs de traitement

Dépendamment de la technique utilisée, la ventilation mécanique permet d'augmenter le volume tidal, de diminuer le travail nécessaire à la respiration, et/ou d'optimiser le rapport ventilation/perfusion⁹⁷. Les objectifs de la ventilation assistée sont de fournir de l'oxygène et d'éliminer le CO₂ tout en limitant les barotraumas, volutraumas et atelectraumas, et les lésions d'oxydation sur l'épithélium pulmonaire. Les objectifs lors du traitement par ventilation assistée en pédiatrie humaine sont de maintenir la PaO₂ entre 55 et 70 mmHg, la PaCO₂ entre 45 et 55 mmHg et le pH entre 7,25 et 7,35⁸⁹. Chez le poulain, les recommandations sont de maintenir une PaO₂ entre 80 et 110 mmHg, et une PaCO₂ suffisante pour rétablir un pH entre 7,35 et 7,45, généralement 60 à 65 mmHg⁹⁷. Lorsqu'on suspecte des lésions pulmonaires importantes dues à la ventilation mécanique, on peut opter pour l'installation d'une hypercapnie permissive. Il s'agit d'utiliser des réglages de ventilateur moins sévères

pour limiter les contraintes exercées par la machine. La PaCO₂ peut être un peu plus élevée que les normales mais le pH est maintenu au dessus de 7,2.

La ventilation mécanique peut créer des lésions pulmonaires si elle n'est pas réglée de façon appropriée. Des volutraumas peuvent apparaître lorsque les alvéoles sont trop distendues par le volume tidal imposé par le respirateur ⁸⁹. Palmer a adapté les recommandations de médecine humaine, et considère qu'un volume tidal de 6 à 10 ml/kg est efficace et sécuritaire ⁹⁷.

II-4-2-c. Modalités

Les réglages suivants ont été recommandés pour la ventilation d'un poulain ⁹⁷.

Tableau IX : Indications de réglages pour la ventilation mécanique chez le poulain ⁹⁷

<i>Paramètres</i>	<i>Valeurs poulain</i>
FiO ₂	0,5 (0,3 à 1,0)
Volume tidal	6-10 ml/kg
Fréquence respiratoire	20-30 rpm
PIP (pic de pression en fin d'inspiration)	8-12 cm d'H ₂ O
PEEP (pression positive en fin d'expiration)	4-5 cm d'H ₂ O

L'augmentation de la F_{iO_2} permet l'apport d' O_2 supplémentaire afin de rétablir la PaO_2 . Le volume tidal et la fréquence respiratoire déterminent le volume minute et donc la ventilation alvéolaire. Le volume tidal est généralement fixé pour un patient donné, en fonction de son poids ^{116,132}. On dit alors qu'on ventile à volume constant. La fréquence respiratoire est alors ajustée de façon à optimiser la ventilation alvéolaire en maintenant une $PaCO_2$ inférieure à 60 mmHg et un pH entre 7,35 et 7.45. La PIP est la pression de l'air inspiré. Elle correspond à la force nécessaire pour faire entrer l'air dans les poumons. Elle est adaptée en fonction de la compliance pulmonaire. Chez un patient dont la compliance est normale, une PIP de 8-12 cm d'eau est suffisante pour insuffler le volume tidal en rapport avec le poids du patient. Cependant chez des patients dont la compliance pulmonaire est diminuée, des PIP de 20 à 25 cm d'eau peuvent être nécessaires, sans excéder 30 – 35 cm d'eau ¹³⁶. Il est également possible de ventiler à pression constante : on fixe alors la PIP et le respirateur insuffle un volume variable dépendant la compliance pulmonaire. La PEEP est la pression positive qui permet de maintenir les alvéoles déployées en fin d'expiration. Cela évite qu'elles se collapsent. La PEEP maximale qui peut être appliquée est de 15 à 20 cm d'eau. Au-delà, le retour veineux est compromis ¹³⁶. Tous les paramètres sont modifiés en fonction de la réponse du patient.

Le sevrage du respirateur doit toujours être progressif et peut être envisagé lorsque le patient est capable de maintenir $PaCO_2$ inférieure à 60mmHg en respirant

spontanément. De plus il doit également être capable de maintenir une PaO₂ de 80 mmHg ou plus en recevant une FiO₂ 35% ou moins ¹³⁶.

Chapitre 2 : Article

Respiratory diseases in neonatal cloned calves.

**Brisville AC¹, Fecteau G¹, Boysen S², Dorval P³, Buczinski S⁴, Blondin P⁵, Smith
LC⁶**

Abbreviations

Aa: Alveolar-arterial oxygen gradient

INO: Intranasal oxygen therapy

PaCO₂: Partial pressure of carbon dioxide in arterial blood (in mmHg)

PaO₂: Partial pressure of oxygen in arterial blood (in mmHg)

PPV: Positive Pressure Ventilation

PvCO₂: Partial pressure of carbon dioxide in venous blood (in mmHg)

PvO₂: Partial pressure of oxygen in venous blood (in mmHg)

Rpm: Respirations per minute

RR: Respiratory Rate

Abstract

Background: Numerous clinical abnormalities occur in cloned calves during the neonatal period.

Objectives: Describe respiratory diseases affecting cloned calves.

Animals: 25 Holstein cloned calves

Methods: Retrospective clinical study of the cloned calves born at the Veterinary Teaching Hospital, St-Hyacinthe, Québec.

Results: Thirty-one cloned calves' records were reviewed. Twenty-five records were included. Four stillborn calves and two calves euthanized at birth were excluded. Twenty-two calves suffered from respiratory diseases. Nineteen calves received intranasal oxygen therapy. They were tachypneic (78 breaths per min) and 5 of them were hypoxemic ($\text{PaO}_2 < 55 \text{ mmHg}$). 2/19 calves remained hypoxemic despite INO. Thirteen calves were weaned from INO after a median of 70 hours and were discharged at a median of 5 days of age. Nine calves required ventilatory support: 3 from birth and 6 after intranasal oxygen therapy. Five were successfully weaned from the ventilator after a median of 32 hours and were discharged at a median of 8 days of age. Three calves died and one was euthanized because of respiratory disease. Necropsy revealed atelectasis, pulmonary congestion, and alveolar damages.

Conclusion and Clinical importance: Respiratory disease occurs frequently in cloned calves. The most frequent abnormality is hypoxemia due to V/Q mismatch. It is possible to successfully support these calves by using intranasal oxygen therapy and mechanical ventilation.

Introduction

Nuclear transfer is a reproductive technology used to produce genetically identical individuals or clones. This technique, which has enabled the birth of healthy individuals in several animal species including cattle ^{1,2}, has many applications ³. However, the effectiveness of this technique is limited. Overall efficiency of somatic cell nuclear transfer was estimated to 4% (number of newborn animals in good health per reconstructed embryos), regardless of species¹². Another reported problem for cattle is high neonatal death rates (from 12.5% to 42%) ^{10,11,13}. Among the main problems at birth are large birth weight or large offspring syndrome ¹⁴, myo-arthroskeletal malformations ¹⁵, respiratory difficulties ¹⁰ and metabolic abnormalities ^{16,17}. Between 2004 and 2007, the University Veterinary Teaching Hospital, at Université de Montréal in Saint-Hyacinthe, was involved with the birth and the first few days of postpartum care in newborn calves derived from somatic cloning. Respiratory abnormalities were one of the main problems observed. The first objective of this study was to describe the abnormalities in respiratory function of cloned calves at birth and throughout the neonatal period. The second objective was to describe the indications, methodology, calves' response and complications of 2 interventions uncommonly used in cattle: intranasal oxygen therapy and mechanical ventilation.

Materials and Methods

The medical records of all cloned Holstein calves born at the University Veterinary Teaching Hospital, between 2004 and 2007, were studied retrospectively. Observations were divided into a “Birth Period” (from birth to 1 hour of age) and a “Neonatal Period” (from 1 hour of age to discharge from the hospital). The duration of gestation, induction technique (if used), and type of parturition were recorded (vaginal vs C-section). Body weight, heart rate, behavior (alert or depressed), appetite, respiratory rate and effort were extracted from the physical examination at birth and at specific times during the neonatal period. Therapies used to support pulmonary function (intranasal oxygen therapy, manual or mechanical Positive Pressure Ventilation), the time they were implemented, the duration of their administration, and the calves’ response to therapy (improvement or deterioration of behavior, respiratory rate, complications, and survival) were all recorded. Additional treatments were also recorded.

Hematology results, thoracic radiographs, and results of blood gas analyses were reviewed. The hematological parameters recorded included red cell count, hemoglobin and hematocrit levels at birth (less than 10 minutes after umbilical cord section). Radiographically visible pulmonary lesions were characterized by board certified radiologists according to pattern (interstitial or alveolar), severity (mild, moderate or severe), and distribution (localized or diffuse). When available, serial thoracic radiographs were characterized as improved, unchanged or worse relative to previous radiographs. Blood gas parameters selected to characterize calves’

respiratory diseases or calves' response to treatment included pH, partial pressure of oxygen and carbon dioxide (PCO₂ and PO₂), and blood levels of bicarbonate and lactate in either venous or arterial blood. The alveolar-arterial oxygen gradient (Aa) was calculated from the PaO₂ and prior to oxygen supplementation using the formula: $Aa = (0.21 * (750 - 47) - PaCO_2 / 0.8) - PaO_2$ ¹³⁷. Barometric pressure in Saint-Hyacinthe is 750 mmHg). The PaO₂/FIO₂ ratio was not used because the percentage of inspired oxygen was unknown when the animals were receiving intranasal oxygen. Calves were considered survivors if they were discharged from the hospital. Necropsy reports of the non surviving calves were reviewed when available.

Normal blood gas values for newborn calves¹³⁸ were used as a the reference range. A calf was considered tachypneic if the respiratory rate (RR) was higher than 60 respirations per minute (rpm)¹³⁹ and bradypneic if RR was below 30 rpm¹³⁹. Signs of dyspnea included increased respiratory effort and abdominal breathing¹⁴⁰.

Arterial blood was collected from the medial branch of the caudal auricular artery via a 24 G, 0.75-inch catheter. The samples were analyzed within 2 minutes with a blood gas analyzer^a.

Intranasal oxygen therapy (INO) and mechanical positive pressure ventilation (mechanical PPV) techniques were described.

Statistical analyses

Continuous data were summarized using mean and standard deviation, or median and range when not normally distributed. Non-continuous data were described using

frequencies. T-test for unequal variance was used to compare the analyses of blood gases and CBC at birth between groups of cloned calves.

Results

Thirty-one medical records were studied. Six of them were excluded: 4 dealt with stillborn animals and the other 2 with animals euthanized less than 6 hours after birth due to severe physical deformities such as arthrogryposis (severe contracture of all limbs). Twenty-five cases were finally included. The mean gestation period was 274 days (standard deviation: 2.6 days, between 269 and 279 days). Parturition was induced by intramuscular injections of dexamethasone^d (20 mg), and cloprostenol^e (25 mg). All calves were born by left flank caesarean section 24 hours after induction. The mean birth weight was 56 kg (standard deviation = 9.1 kg). There were 5 females (median = 65 kg; from 35 to 82 kg) and 20 males (median = 54 kg; 45 to 72 kg).

Abnormalities of respiratory function during “Birth Period”

Eighteen of the 25 calves were breathing spontaneously at birth (Figure 1) with an effective respiratory rate whereas seven had severe bradypnea (less than 10 bpm) or apnea: they were intubated at birth using an orotracheal tube, and manually ventilated. Four of them were extubated after 15 to 60 minutes of manual PPV when they demonstrated an effective respiration. In 3/7 calves, respirations did not improve and these calves were switched from manual PPV to mechanical PPV with an initial FIO₂ set at 100%.

An analysis of venous blood taken from the jugular vein was performed on all calves within 5 minutes of birth and before any treatment was initiated (Table 1). Calves

with a low respiratory rate at birth had statistically lower pH ($p = 0.002$), bicarbonates ($p = 0.01$), hemoglobin ($p = 0.001$) and hematocrit ($p = 0.01$) and statistically higher PvCO₂ ($p = 0.01$). The different mean lactate concentration was not statistically significant ($p = 0.057$).

Abnormalities of respiratory function during “Neonatal Period”

Among the 18 calves that had an effective respiratory rate at birth 9 developed respiratory diseases within the first 12 hours of age (mostly within 2 hours of age except for 2 calves at 4 and 9h of age) whereas 6 developed respiratory diseases after 24 hours of age. The remaining 3 calves remained healthy and were discharged from the hospital within two days of birth. Of the 7 calves that had an ineffective respiratory rate at birth, 3 required prolonged mechanical ventilation during the neonatal period, 3 had persistent respiratory diseases following initial cessation of manual PPV, and 1 was able to breath normally after initial manual PPV, but developed respiratory diseases after 24 hours of age. Respiratory diseases observed included dyspnea (22/22), tachypnea (14/22), bradypnea (3/22), hypoxemia (5/22) and hypercapnia (19/22 calves of which 8 had a PaCO₂ greater than 80 mmHg).

Thoracic radiographs were performed in 21/22 calves within 6 hours after birth (Table 2). Thoracic radiographs could not be performed in one calf because it was receiving mechanical PPV and was considered too unstable to be transported to the imaging room. This calf eventually died. Thoracic radiographs were repeated at 1 day of age in 17 calves, all of which had previous radiographic abnormalities. Comparing

radiographs at birth and one day of age in the calves that died, all calves had severe progressive radiographic lesion.

The respiratory rate was recorded for 18/19 calves immediately before oxygen therapy. Their mean respiratory rate was 74 +/- 14 rpm with 14/18 being tachypneic. An arterial blood gas analysis was performed in 10 calves before receiving intranasal oxygen (Figure 2 and 3). All of them were tachypneic. Five had a PaO₂ lower than 55 mmHg (reference range = 55.3 - 88.5 mmHg) and 6 (including 5 hypoxemic calves) had a moderate degree of hypercapnia (Table 3). The Aa gradient was greater than 30 mmHg for the 5 hypoxemic calves.

Therapies to support pulmonary function

All 22 calves that developed respiratory diseases received supplemental oxygen therapy, either intranasally or via a respirator (Figure 1).

Intranasal oxygen therapy (INO)

All calves suspected to have respiratory diseases received INO as a first line therapy. INO was administered via 1 or 2 intranasal flexible plastic tubes attached to a halter and inserted into the nostrils at a length of about 8 to 10 cm depending on the size of the calf. The end of the plastic tubes had additional holes added to prevent occlusion of the tubes and to decrease the risk of “jet lesions” at high oxygen flow rates. The oxygen flow per tube ranged from 1 to 15 L/min (or 30 L O₂/min per animal). The administered oxygen was humidified at room temperature and the positions of the tubes were verified every hour.

An arterial blood gas analysis was obtained from 17/19 calves receiving INO within 6 hours of initiating treatment. Fifteen calves had a PaO₂ above 80 mmHg while receiving oxygen flow rates between 67 and 421 ml O₂/kg/min. Their mean PaCO₂ was 59.8 +/- 10.1 mmHg and 10/15 were hypercapnic. Their mean respiratory rate was 67 +/- 21 rpm and 8/15 were tachypneic. Two calves remained hypoxemic (PaO₂ = 33.2 and 41.5 mmHg) while receiving 238 and 200 ml O₂/kg/min respectively. Their respective PaCO₂ was 55.7 mmHg and 103.9 mmHg. Their respective pH was 7.23 and 7.04. The former's respiratory rate was 72 rpm and the latter's was not available. These two calves were subsequently treated with mechanical PPV. Of the 19 calves treated with intranasal oxygen therapy as a first-line treatment, 13 calves were successfully weaned off oxygen after a median of 70 hours (from 54 to 283 hours). They were subsequently discharged from the hospital. The remaining 6 calves were treated with mechanical PPV.

The complications observed during the administration of intranasal oxygen were minor. The removal of the tubes was observed with all calves either because the shape of the tube did not conform to their nasal morphology or because the tube was too short. Moreover, even when a tube was properly adjusted, the calves were able to dislodge the tubes via the process of licking. Another complication observed less frequently (n = 2) was the obstruction of the tubes by dried secretions. These complications were prevented by regularly checking the position of the tubes (every hour), adding additional holes to the tubes, by adapting the shape of the tubes to the morphology of the calves, by fixing the tubes in place with halters, and by cleaning

them and checking the permeability of the tubes, daily if necessary, by withdrawing them from the nose.

Mechanical positive pressure ventilation (mechanical PPV)

Low respiratory rate at birth, persistent hypoxemia despite INO and hypoventilation based on severe hypercapnia ($\text{PaCO}_2 > 80$ mmHg) associated with acidemia ($\text{pH} < 7.2$) were indications for mechanical PPV.

During mechanical PPV, calves were intubated with a nasotracheal tube (6 – 7.5 mm inner diameter) and placed on a respirator^b. The calves were not sedated during mechanical ventilation unless necessary. Naso-tracheal intubation allowed the calves to move freely and to be fed orally. Blood gas analysis were performed at intervals varying from 15 minutes to 2 hours and allowed the respirator to be adjusted to the needs of each calf. The objectives of mechanical ventilation were similar to those previously published in cloned calves¹⁴¹. A Synchronized Intermittent Mandatory Ventilation (SIMV) mode was used in all calves. Delivered mechanical breaths per minute ranged between 24 and 42, dependent on PaCO_2 and pH values. The FiO_2 setting ranged between 30 and 100% and was adjusted to the minimal value that maintained PaO_2 greater than 100 mmHg. The initial tidal volume was set at 5 ml/kg and was increased in 2 ml/kg increments up to 10 ml/kg based on PaCO_2 and pH values. Positive end-expiratory pressure was used to prevent alveolar collapse, improve alveolar recruitment, and decrease alveolar shear stresses, and ranged between 3 and 7 cm H_2O . Positive inspiratory pressures ranged between 20 and 30

cm H₂O. The respirator settings were adjusted to maintain pH greater than 7.2, PaCO₂ less than 60 mmHg, and PaO₂ above 100 mmHg.

Nine calves were mechanically ventilated during their neonatal period at the hospital (Figure 1): 3 at birth due to non-effective respiratory rates, 2 because they remained hypoxemic despite INO and 4 because they suffered from severe hypercapnia associated with acidemia later than 6 hours after initiating INO. Arterial blood gas results were obtained for 6 calves prior to starting mechanical PPV (Table 4). All 6 of these calves were receiving INO at the time blood gases were drawn.

Of the 9 calves mechanically ventilated, 5 calves were successfully weaned from the ventilator after a median duration of 32 hours (18 hours to 48 hours). One calf died after an episode of severe hypoventilation (PaCO₂ = 85.2 mmHg) 10 hours after the initial weaning from the respirator. The owner declined the recommendation to reinstitute mechanical PPV. Three calves were never weaned from the respirator. Two died of respiratory failure and the third was euthanized due to moderate arthrogryposis and lack of improvement in respiratory function despite mechanical PPV. They remained on a mechanical PPV with 100% oxygen for 13 hours, 38 hours and 27 hours, respectively.

Few complications were observed with mechanical PPV. One calf struggled against the ventilator and had to be weaned early. Two calves extubated themselves during periods of agitation. They were reintubated immediately via the nasotracheal route and temporarily sedated with diazepam^f (0.1 mg/kg IV, single dose). Finally, partial obstruction of the nasotracheal tube by dry bronchial secretions was observed in 2

calves, which were mechanically ventilated for more than 24 hours. The tracheal tubes were cleaned via aspiration or replaced.

Outcome

Four calves died, three spontaneously and one was euthanized (Figure 1). Necropsy reports were available for 3 of the calves. One or more of the following lung lesions were present in each of these calves: pulmonary congestion, atelectasis, or diffuse alveolar damages with presence of material in the alveolar space (fibrin (n = 2), keratinized cells (n = 1), hyaline membranes (n = 1) and meconium (n = 1). In addition emphysema (n = 1), thoracic and pericardial effusion (n = 1), hepatic congestion (n = 2) and a patent foramen ovale (n = 1) were also observed. A presumptive diagnosis of hyaline membrane disease or pulmonary immaturity was described for each of the 3 necropsies. The calf whose necropsy report was not available, died of suspected respiratory failure (last arterial blood gas levels on mechanical PPV: pH = 7.12, PaO₂ = 36.2 mmHg, PaCO₂ = 92.1 mmHg, bicarbonates = 29.3 mmol/L, lactate = 22.5 mg/dL). Furthermore, the 4 still-born calves had a post-mortem examination. The findings included signs of chronic lung inflammation (macrophages were observed within the pulmonary lesions).

The other 21 calves (Figure 1) left the hospital in good health. The mean duration of hospitalization for the cloned calves was 6.3 days (standard deviation: 4.1, between 1 - 21 days). The 3 calves that did not suffer from respiratory diseases were discharged after a median hospital stay of one day (1-2 days). The calves that received only intranasal oxygen left the hospital after a median hospital stay 5 days (3 - 14 days)

and 10/13 remained hospitalized for less than a week. Finally, the calves mechanically ventilated were discharged from hospital after 6, 5, 8, 14, 16 days.

Discussion

Respiratory diseases in the neonatal period have been reported with an incidence varying from 0 to 90% in neonatal cloned cattle ^{10,13,15-17}. Our observations are consistent with the literature that respiratory diseases are a limiting factor in the survival of cloned calves during the neonatal period. Excluding calves euthanized due to malformations, respiratory diseases were the only cause of death among calves during their hospitalization.

Respiratory diseases affecting cloned calves were characterized by varying degree of hypoxemia, hypercapnia, and tachypnea. There are a number of possible underlying conditions that have been reported in the bovine, equine and human literature that might explain the respiratory diseases observed in this study.

One pattern of respiratory disease observed in cloned calves was a combination of hypoxemia, mild hypercapnia and elevated alveolar to arterial oxygen gradients. The condition developed within 1 to 24 h after birth, and a favorable response to intranasal oxygen therapy was observed. These blood gas abnormalities were consistent with a moderate degree of hypoventilation and ventilation-perfusion mismatch (V/Q mismatch). The pattern could be comparable to transient tachypnea of the newborn in human neonatology ¹⁰³ or idiopathic transient tachypnea in equine neonatology ¹⁰⁴. In human newborns, moderate hypoxemia and tachypnea developed within 6 h of birth secondary to delayed resorption of fetal pulmonary fluid ¹⁰³.

Disease is self-limiting and resolve in 3 to 4 days¹⁰³. In equine neonatology, tachypnea developed in hyperthermic foals in hot and humid environments, as a result of presumptive imbalance of thermoregulation¹⁰⁴. Cloned calves from this study showed no increase in rectal temperature at the onset of respiratory abnormalities and the ambient temperature was controlled. Delayed resorption of pulmonary fluid is a plausible hypothesis. It can be further noted that cesarean births have been identified as a risk factor for the onset of transient tachypnea of the newborn in human neonatology¹⁰³.

A second pattern of respiratory disease observed in cloned calves was a severe hypoxemia that did not improve with intranasal oxygen therapy. This pattern could be consistent with a right to left shunt resulting from a persistent fetal circulation. Failure of closure of the foramen ovale and ductus arteriosus, resulting in a persistent pulmonary hypertension, is described in human¹¹⁰, equine¹⁰⁴ and bovine neonates^{13,142}. In calves, clinical signs include hypoxemia, mild hypercapnia, tachypnea, and elevated pulmonary artery pressure^{13,142,143}. Signs of pulmonary hypertension have previously been reported in one cloned calf that died of respiratory diseases in the neonatal period¹³. The pulmonary artery pressure was not measured in the cloned calves of this study because of the invasiveness of the procedure.

A third pattern of respiratory disease observed in cloned calves was a combination of hypoxemia and severe hypercapnia that developed within 6 hours of birth. These blood gas abnormalities were consistent with hypoventilation and V/Q mismatch. The importance of V/Q mismatch was difficult to assess since no arterial blood gas analysis was available prior to oxygen supplementation and alveolar-arterial gradients

were not estimated. However, this pattern could be comparable to neonatal respiratory distress syndrome described in human ^{101,144} and bovine neonates ^{94,145}. Respiratory distress syndrome result from surfactant deficiency ¹⁰¹ and occurred in premature newborns or secondary to inactivation of surfactant by meconium or lung inflammation ¹⁴⁶. Without functional and sufficient surfactant, the pulmonary alveoli collapse due to surface tension and the work of breathing increases ¹⁰¹. The newborn progresses to a state of exhaustion and breathing become inefficient. In human neonatology, neonatal respiratory distress syndrome is self-limiting and mechanical ventilation can support respiratory function until the newborn produces surfactant in sufficient quantity and quality ¹⁰¹.

The administration of intranasal oxygen therapy (INO) is a common supportive therapy used in older animals ^{133,141,147,148}. In this retrospective study, the decision to initiate the intranasal oxygen therapy was based on an analysis of arterial blood gases when available. When arterial blood gas analysis was not available, the following clinical parameters were used: alertness, quality of breathing, RR, interest in their surroundings, and ability to stand or suckle. Although these clinical parameters are subjective, the clinical experience of this study suggests they are important clues to the onset of respiratory diseases in newborn cloned calves. Other teams who have worked with cloned calves have chosen to systematically administer intranasal oxygen at birth for at least 30 minutes ^{13,16}. The incidences of respiratory diseases in these studies were 37.5% ^{13,16} and 50% ¹³, which are lower than in our study (88%, 22/25). Thus the routine use of intranasal oxygen appears to be a valuable option in the management of cloned calves during the neonatal period.

The use of mechanical ventilation has been reported in equine neonatal intensive care units ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. There are only two publications reporting the use of mechanical ventilation in cattle, both in newborn cloned calves ^{13,141}. Newborn calves tolerated mechanical ventilation without sedation and nasotracheal intubation allows calves to continue suckling while on a respirator. Animals can therefore be maintained on a respirator for extended periods of time without the risks associated heavy sedation or anesthesia.

A final interesting observation concerning this study is the advantages and limits of arterial blood gas analyses. An increase in respiratory rate and effort prompted clinicians to supplement these animals with intranasal oxygen upon clinical suspicion of hypoxemia. The treatment led to clinical improvement, including the return of a suckling reflex. For some of these animals, an arterial blood gas analysis was available just prior to the start of oxygen therapy. Half of these calves had normal PaO₂ values compared with published reference ranges ¹³⁸. Two hypotheses may explain the difference between clinical suspicion and laboratory analysis. First, the published values ¹³⁸, which mainly refer to Simmental and Brown Swiss calves born after natural parturition, might be inadequate as a reference range for Holstein cloned calves born by caesarean section. Breed, prematurity, and birth method could be factors influencing PaO₂ in the neonatal period. Blood gas values obtained from healthy newborn Holstein calves without respiratory difficulties, born by Caesarean section, may be more comparable references for the cloned calves in our study. Second, cloned calves may have suffered from some degree of hypoxia despite a PaO₂ considered normal according to Bleul et al. ¹³⁸. Severe anemia can cause

hypoxia independent of PaO₂ and oxygen saturation values. Also, a structural abnormality of hemoglobin, modifying its dissociation curve, would decrease oxygen delivery to the tissues. Anemia was observed in the cloned calves of this study, but it is difficult to determine if it was severe enough to cause hypoxia. In addition, the calves were weaned from oxygen after approximately 3 days and without transfusion therapy. This duration seems insufficient to coincide with the correction of anemia.

Conclusion

The incidence of respiratory problems in cloned calves is high. Different pattern of respiratory problems were observed. It is plausible that more than one disease affects cloned calves, and the exact causes of respiratory problems still needs to be determined. In addition, intranasal oxygen therapy and mechanical ventilation could be used in neonatal cloned calves without severe complications. Attentive monitoring is still required and may include arterial blood gas analysis and radiography.

Endnotes

^a Stat profile M, Nova Biomedical® Mississauga, ON

^b Esprit Ventilator, Respironics Inc., Vista, CA

^c SAS 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC

^d Dexamethasone 5, Vétquinol, Lavaltrie, QC

^e Lutalyse, Pfizer, London, ON

^f Valium, Roche, Nutley, NJ

Table 1: Analysis of venous jugular blood samples (*).

Parameters	Calves with an effective respiratory rate at birth (n = 18)	Calves with a non-effective respiratory rate at birth (n = 7)
pH (p = 0.002)	7.22 +/- 0.08	7.06 +/- 0.08
PvCO ₂ (mmHg) (p = 0.01)	68.9 +/- 9.0	79.8 +/- 7.8
Lactate (mmol/L) (p = 0.057)	9.1 +/- 2.8	13.1 +/- 4.4
HCO ₃ ⁻ (mmol/L) (p = 0.01)	28.1 +/- 3.5	22.1 +/- 4.0
Red cell count (*10 ⁶ /μL)	6.08 +/- 1.02	5.31 +/- 1.18
Hemoglobin (g/dL)	8.0 +/- 1.8	5.6 +/- 1.2
Hematocrit	27.8 +/- 5.9	21.6 +/- 4.2

(*) Samples were obtained prior to any treatment and within 5 minutes of birth.

Values are reported as mean +/- standard deviation.

Table 2: Comparison of thoracic radiographic lesions and outcome in 21 cloned calves diagnosed with respiratory problems.

Classification of thoracic radiographs		Outcome	
		Calves that lived n=18	Calves that died n=3
Severity	Mild	4	0
	Moderate	5	0
	Severe	7	3
Pattern	Interstitial	8	2
	Alveolar	8	1
Distribution	Localized	4	1
	Diffuse	12	2
Evolution	Improvement	7	0
	Unchanged	4	0
	Worse	3	3
	No re-evaluation	2	0
Normal thoracic radiographs		2	0

Table 3: Arterial blood gas analysis of 10 neonatal cloned calves before the initiation of intranasal oxygen therapy.

Parameter	Cloned calves	Reference range	Number of cloned calves out of reference range
pH	7.36 (7.16 – 7.47)	7.35 – 7.47	4/10
PaO ₂ (mmHg)	49.9 (39.4 – 82.6)	55.3 – 88.5	5/10
PaCO ₂ (mmHg)	55.0 (44.9 – 63.8)	34.2 – 53.2	6/10
Aa (mmHg)	25 (2.7 – 44 .2)	23.5 (calculated mean)	5/10 > 30

Values are reported as median (minimum – maximum)

Reference from Bleul¹³⁸, are reported as mean +/- 2 standard deviations

Table 4: Arterial blood gas analysis of 6 neonatal cloned calves prior to mechanical PPV

Parameter	Cloned calves	Reference range	Number of cloned calves out of reference range
pH	7.324 (7.04 – 7.28)	7.35 – 7.47	6/6 lower
PaO ₂ (mmHg)	78.7 (33.2 – 259.9)	55.3 – 88.5	2/6 higher and 2/6 lower
PaCO ₂ (mmHg)	84.5 (55.7 – 103.9)	34.2 – 53.2	6/6 higher

Values are reported as median (minimum – maximum)

Reference from Bleul¹³⁸ are reported as mean +/- 2 standard deviations

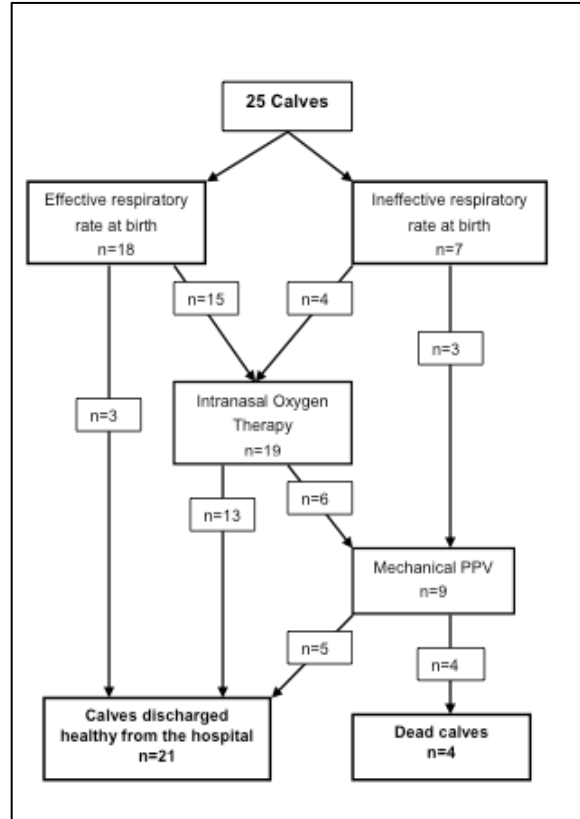


Figure 1: Flow chart of respiratory therapy and outcome of 25 cloned calves classified as having effective or ineffective respiratory rates within 1 hour of birth.

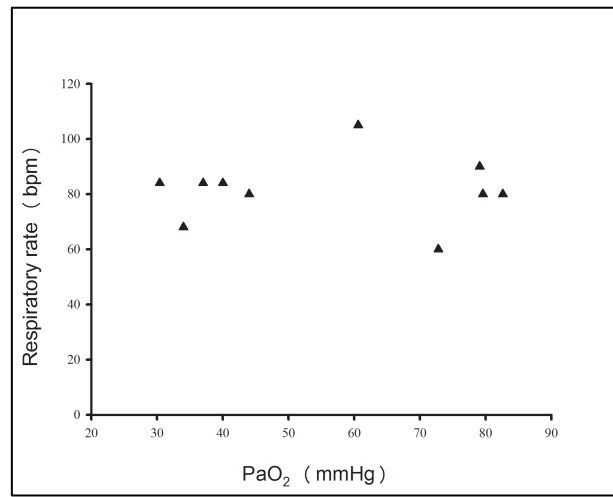


Figure 2: Respiratory rate and PaO₂ in 10 cloned calves before receiving any respiratory support

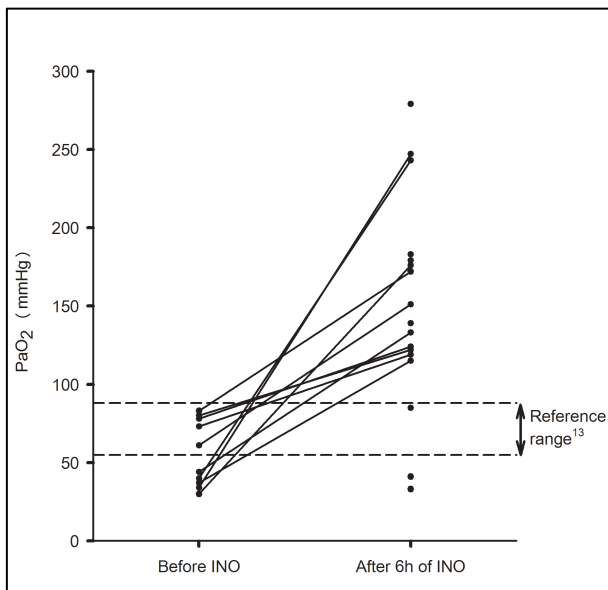


Figure 3: PaO₂ (mmHg) in cloned calves before (n=10) and 6h after (n=17) the initiation of intranasal oxygen therapy

Same calf's values for PaO₂ before and after intranasal oxygen therapy (INO) are joined with a line.

Chapitre 3 : Discussion

Cette étude a montré que la morbidité néonatale due aux problèmes respiratoires est élevée chez les veaux clonés. L'adaptation à la vie extra-utérine est difficile et un certain nombre de veaux en meurent.

I. Problèmes respiratoires et soutien

I-1. Incidence des problèmes respiratoires et principale cause de mortalité en période néonatale

La forte incidence des problèmes respiratoires en période néonatale est un fait marquant chez les veaux clonés nés au CHUV de la Faculté de Médecine Vétérinaire de St-Hyacinthe. Des problèmes respiratoires en période néonatale ont été rapportés par plusieurs équipes travaillant sur des clones bovins avec une incidence variable. Une étude de 1999 a rapporté une incidence des problèmes respiratoires de 56% (5/9)¹³. Une autre étude¹⁵ rapporte des analyses de gaz sanguins artériels dès la naissance (Annexe 1). Cette étude démontre que les veaux clonés étaient hypoxémiques à la naissance et au cours de la première heure de vie avec une PaO₂ variant entre 38 et 45 mmHg de moyenne et une variation individuelle importante puisque l'écart-type variait entre 14 et 10 mmHg. Cependant la mortalité en période néonatale est faible (1/40 soit 2.5%). L'hypoxémie serait alors être transitoire et sans effet sur la santé des veaux après la première heure de vie dans cette étude. Les veaux clonés de cette étude ont quand même reçu une insufflation intranasale, entre autres supports médicaux. Cependant la durée de cette insufflation et si elle était faite avec de l'oxygène n'est pas détaillée. L'oxygène intranasal administré à 34/40 veaux

pourrait expliquer en partie la faible incidence des maladies respiratoires rapportées dans cette étude comme cause de mortalité néonatale même si veaux ont par la suite souffert de pneumonie entre 4 jours et 6 semaines. Une étude rétrospective sur 388 veaux nés vivants ¹⁰ rapporte 19% de problèmes respiratoires avant l'âge de 150 jours. Par contre, dans une autre étude, expérimentale ^{16,17}, aucun des 8 veaux clonés étudiés n'a présenté de problèmes respiratoires alors qu'ils avaient tous reçu de façon préventive de l'oxygène dès la naissance. Nos observations sont donc cohérentes avec la littérature et les problèmes respiratoires sont un facteur limitant la survie des veaux clonés au cours de la période néonatale. Il s'agit également de la seule cause de mortalité chez les veaux de notre étude pendant leur hospitalisation.

I-2. À propos des maladies respiratoires des veaux clonés

I-2-1. Syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né

Parmi les maladies suspectées, le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né est la mieux connue chez le veau. Ce syndrome s'observe le plus souvent chez des animaux nés avant terme ⁹⁴ et est due à une déficience du surfactant ¹⁰². Dans notre étude, les veaux étaient prématurés de tout au plus 1 semaine. Cependant les lésions pulmonaires macroscopiques et histologiques observées étaient les mêmes que celles rapportées dans cette maladie ⁹² (voir partie II-2-2-b). La déficience de surfactant peut être primaire ou secondaire. La déficience primaire implique un individu dont les poumons sont immatures au moment de la naissance. Les pneumocytes II n'ont pas eu le temps de fabriquer le surfactant en quantité suffisante pour assurer sa fonction et éviter le collapse des alvéoles après les premières

respirations. La déficience secondaire en surfactant est due à son inactivation par du méconium ou l'inflammation pulmonaire ¹⁴⁶. Chez les veaux clonés de notre étude la déficience en surfactant pourrait être primaire ou secondaire. S'il s'agit d'une déficience primaire elle serait atypique puisque les veaux sont nés très près du terme de la gestation et que la maturation pulmonaire avait en plus été induite avec une injection de corticostéroïdes aux mères porteuses 24h avant la césarienne. Cependant les ratios lécithine/sphingomyéline n'ont pas été effectués sur les liquides amniotiques pour nous apporter la preuve que les poumons étaient matures au moment de la naissance. Une déficience secondaire est également possible puisque du méconium a été observé dans les poumons d'un veau mort de problèmes respiratoires en période néonatale. L'hypoxie *in utero* peut entraîner l'émission de méconium et la survenue de mouvements respiratoires prématurés chez le fœtus. Cependant cette situation s'observe le plus souvent autour de la mise-bas lors de dystocie ou de parturition très lente (lorsque la mère est hypocalcémique par exemple) ce qui n'était pas le cas pour nos veaux clonés. Certaines études sur la placentation des veaux clonés ont mis en évidence des anomalies de développement, et notamment de vascularisation ¹⁵¹, qui pourraient être préjudiciables au développement du fœtus *in utero* ^{152,153}. Des placentas œdémateux sont une des anomalies macroscopiques observées lors des placentations de veaux clonés ¹⁵². On peut imaginer aisément qu'un placenta œdémateux compromet les échanges foeto-maternels. Comme l'oxygène diffuse moins bien lors d'œdème pulmonaire ¹³², il diffuse probablement moins bien à travers un placenta œdémateux. Les veaux clonés sont-ils hypoxiques *in utero* ? De plus ils ont probablement des besoins plus importants en raison de la

grande taille. Tous ces éléments assemblés pourraient contribuer à rendre les veaux clonés de notre étude hypoxiques pendant la fin de gestation, avant la survenue de la mise-bas. Ainsi ils pourraient avoir débuté des mouvements respiratoires in utero et aspiré des particules amniotiques avec ou sans méconium. Dans cette situation la décision de faire naître les veaux clonés par césarienne n'a pas été aussi salubre que prévu puisqu'une période d'hypoxie n'a pas pu être évitée. Cependant devancer la naissance de plus longtemps exposerait les veaux à une immaturité pulmonaire. Ce n'est pas la meilleure solution.

Afin de minimiser les conséquences de la période in utero et prévenir l'installation d'un syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né, l'administration de surfactant pourrait être envisagée. Des solutions commerciales ou dérivées de surfactant naturel bovin ou porcine sont utilisées chez l'enfant nouveau-né¹⁵⁴. Ces solutions commerciales sont coûteuses de part la quantité nécessaire à administrer pour un veau de 60 kg. Une équipe a préféré préparer leur propre surfactant à partir de poumons de bovins abattus⁶⁸. L'administration de surfactant aux veaux sur lesquels on suspecte une déficience du surfactant est à envisager. Il faudrait faire attention aux contraintes sanitaires d'utiliser du surfactant naturel.

I-2-2. Tachypnée transitoire du nouveau-né

Certains veaux de cette étude étaient hypoxémiques, légèrement hypercapniques et avaient un gradient alvéolo-artériel augmenté. Ces modifications des gaz sanguins sont compatibles avec un degré modéré d'hypoventilation et une anomalie de ventilation/perfusion. Ces veaux ont reçu de l'oxygénothérapie

intranasale et ont répondu favorablement. Cette présentation clinique et cette évolution sont comparables à la tachypnée transitoire du nouveau-né, décrite en néonatalogie humaine ^{103,144}. Cette maladie affecte principalement les nouveau-nés à terme ou légèrement prématurés dans les 6h qui suivent la naissance, et se manifeste par l'apparition d'une tachypnée (à partir de 60 rpm et jusqu'à 140 rpm comparé à la fréquence respiratoire normale qui est de 30 à 60) ¹⁰¹. Les symptômes d'hypoxie sont modérés et inconstants et son évolution est favorable en 3 à 4 jours ¹⁰². La tachypnée transitoire du nouveau-né est généralement considérée comme secondaire à un retard de la résorption du fluide pulmonaire qui occupe le tractus respiratoire ¹⁰³ au cours de la gestation. Au moment de la naissance ce fluide est majoritairement et rapidement résorbé par l'épithélium pulmonaire ¹⁰³. Un syndrome similaire est également décrit chez le poulain ¹⁰⁴. La tachypnée transitoire idiopathique du poulain est généralement observée dans un environnement chaud et humide, et les animaux affectés souffrent également d'hyperthermie. Cette maladie est considérée comme un déséquilibre de la thermorégulation du poulain ¹⁰⁴. Les veaux clonés de cette étude n'ont pas présenté d'augmentation de la température rectale au moment de l'apparition des anomalies respiratoires et leur environnement était tempéré. Une anomalie de la thermorégulation semble peu probable comme cause d'apparition de la tachypnée. Par contre, un retard dans la résorption du fluide pulmonaire est une hypothèse plausible. On peut de plus noter que chez le nourrisson, la naissance par césarienne a été identifiée comme un facteur de risque d'apparition de la tachypnée transitoire du nouveau-né ¹⁰³.

I-2-3. Hypertension pulmonaire persistante

Un veau cloné a présenté une hypoxémie sévère ne s'améliorant pas sous oxygénothérapie intranasale, tandis que sa PaCO₂ restait normale. Aucune analyse des gaz artériels n'était disponible sans oxygénothérapie donc le gradient alvéolo-artériel n'a pas pu être calculé. Ces modifications des gaz sanguins sont pourtant compatibles avec un shunt droite-gauche. Cette présentation est compatible avec une persistance de la circulation fœtale caractérisée par une hypertension pulmonaire persistante. Lorsqu'elle est primaire, la persistance de la circulation est due à un retard de fermeture du *foramen ovale* et du *ductus arteriosus*. Cette maladie est bien décrite en néonatalogie humaine ¹¹⁰ et équine sous le nom de hypertension pulmonaire du nouveau-né ou hypertension pulmonaire persistante. Chez le veau, qui est utilisé comme modèle animal pour cette maladie, les signes cliniques d'hypertension pulmonaire sont de l'hypoxémie, parfois une légère hypercapnie, de la tachypnée et une élévation de la pression dans l'artère pulmonaire ^{13,142,143}. De plus, les constatations *post-mortem* sont une congestion passive hépatique, une dilatation et hypertrophie du ventricule droit et un élargissement de l'artère pulmonaire ¹³.

Des signes d'hypertension pulmonaire ont précédemment été rapportés chez des veaux clonés morts de problèmes respiratoires en période néonatale ¹³. Une mesure de la pression dans le tronc pulmonaire n'a jamais été réalisée sur les veaux clonés de cette étude en raison du caractère invasif de la procédure. Par ailleurs, l'évaluation de la pression dans le tronc pulmonaire par échocardiographie n'est pas encore standardisée chez l'espèce bovine. Cependant l'évolution clinique d'au moins un veau pourrait être compatible avec de l'hypertension pulmonaire persistante.

I-2-4. Apnée

D'autre part un certain nombre de veaux étaient apnéiques ou sévèrement bradypnéiques à la naissance. Ils ont eu besoin d'être ventilés mécaniquement afin d'augmenter leur fréquence respiratoire et/ou de permettre une bonne expansion pulmonaire. Les veaux de notre étude sont nés par césarienne. La parturition avait été induite chez toutes les mères porteuses avec des prostaglandines F2alpha et de la dexaméthasone afin de stimuler la synthèse de surfactant¹⁰⁰. Cependant la parturition n'était pas amorcée au moment de la césarienne. Il a précédemment été rapporté chez la race Bleu-Blanc Belge que la fonction respiratoire du veau était meilleure si la césarienne est pratiquée en phase 1 de la parturition¹⁵⁵. Pratiquer la césarienne alors que le vêlage a commencé pourrait être une solution pour limiter l'incidence des problèmes respiratoires. Une autre solution pourrait être de préparer le fœtus à la naissance en utilisant un protocole d'induction progressive sur 7 jours qui consiste à donner des doses plus faibles de dexaméthasone comparé au protocole unidose. Le déclenchement de la parturition est beaucoup plus progressif permettant une production suffisante de surfactant.

I-3. À propos de l'hypoxémie

I-3-1. L'oxygénothérapie devrait-elle être systématique

L'oxygène intranasal a été largement utilisé au cours de cette étude, avec un certain succès. Une autre équipe travaillant avec des veaux clonés ont choisi d'administrer systématiquement de l'oxygène intranasal à la naissance et l'incidence

de problèmes respiratoires a été inférieure à la nôtre ^{72,73}. Cependant ils n'ont pu clairement démontrer que les veaux en aient eu besoin. Est-ce que l'incidence de problèmes respiratoires était diminuée les veaux étaient supplémentés en oxygène dès la naissance ou simplement parce que ces veaux n'auraient de toutes façons pas développé de problèmes respiratoires. Je ne pense pas que cette étude soit une démonstration suffisante pour décider de supplémenter systématiquement les veaux clonés naissants en oxygène intranasale. De plus il est important de garder à l'esprit que l'oxygène a des effets néfastes non négligeables. Dans les années 40-50 en médecine humaine, il était fréquent de mettre les nouveau-nés prématurés en couveuses supplémentées en oxygène. Plus tard, les pédiatres ont identifié la rétinopathie du prématuré. On attribue encore à l'heure actuelle une part de responsabilité de cette maladie à l'utilisation systématique de l'oxygène sur les bébés prématurés ¹⁵⁶. Cette anecdote rappelle que l'oxygène a des effets néfastes qu'il faut prendre en compte parmi lesquels des effets oculaires, pulmonaires et nerveux centraux.

I-3-2. À propos de l'interprétation de la PaO₂ vs effet de l'oxygénothérapie

Certains veaux, tachypnéiques et anorexiques, que nous avons suspecté d'être hypoxémiques avaient des valeurs de PaO₂ semblables à des valeurs publiées chez des veaux nouveau-nés en santé ¹²³. Nous avons eu l'impression clinique qu'ils s'amélioraient avec l'administration d'oxygène intranasal. Cependant, basé sur les gaz sanguins, il n'est pas démontré qu'ils en aient eu besoin. En effet, les veaux avaient une Pao₂ entre 61 et 83 mmHg avant l'oxygénothérapie (entre 24 et 53h de

vie), soit dans les références publiées pour des veaux nouveau-nés (67 mmHg de moyenne et 14 mmHg à 24h de vie¹²³). Deux hypothèses s'opposent. Soit ils étaient vraiment hypoxémiques et les valeurs que nous avons prises comme références ne sont pas des adéquates pour les veaux clonés Holstein. Soit effectivement ils n'étaient pas hypoxémiques mais le travail respiratoire qui leur était nécessaire pour maintenir une PaO₂ et donc une oxygénation adéquate était tellement importante que leur état clinique en était affecté. Ils devenaient tachypnéique et anorexiques. Cette seconde hypothèse suggère qu'ils étaient dans une phase encore compensatrice et que l'oxygène intranasal leur a permis de passer cette étape sans décompenser et devenir hypoxémiques (puis hypoxiques). Une autre observation clinique va dans le sens de cette hypothèse. Nous avons eu l'impression que plus rapidement nous commençons l'oxygène intranasal, plus rapidement les veaux se rétablissent, recommencent à téter et reprennent un comportement normal. Il est dans ce cas intéressant de commencer l'oxygène intranasal précocement dans l'installation de la maladie respiratoire. Cependant cette hypothèse ne pourra pas être démontrée car il aurait fallu laisser les veaux clonés suspects (tachypnéiques et anorexiques) évoluer pour observer si leur PaO₂ diminuait en dessous des valeurs de référence.

I-3-2. À propos de l'hypoxémie vs l'anorexie

Enfin, certains veaux, tachypnéiques et anorexiques étaient réellement hypoxémiques. Le lien entre l'anorexie et l'hypoxémie n'est pas claire. On imagine aisément que dans une situation de détresse respiratoire l'effort nécessaire pour boire complètement un biberon est trop grand mais cela n'explique pas complètement la

disparition du réflexe de téter. Une autre étude ¹⁵ a rapporté que l'administration d'oxygène intranasal avait permis d'améliorer l'appétit de veaux clonés hypoxémiques. Leurs observations sont similaires aux nôtres. Ils rapportent un état d'hypoxémie (PaO₂=45mmHg +/-11,4 en respirant l'air ambiant) mais l'étude était à 1524m d'altitude. Il est donc difficile de comparer ces valeurs avec les valeurs de référence que nous avons utilisées ou aux valeurs que nous avons observées. Cependant l'évaluation clinique des veaux ne semblait laisser aucun doute sur l'utilisation d'oxygénothérapie. Bien que cela ne constitue pas une démonstration objective, il semble plausible de supposer que l'anorexie ait un lien avec l'hypoxie dans ces cas. En médecine humaine, les effets de l'hypoxie incluent des changements dans le fonctionnement du système nerveux central, en particulier des centres supérieurs comme le cortex ¹⁵⁷. Les signes cliniques qui y sont associés sont une modification du jugement, de l'incoordination, de l'apathie et de la fatigue entre autres ^{132,157}. On peut imaginer que l'anorexie est une conséquence de l'altération de l'état général et de l'abattement. Cependant une action directe sur le centre de la satiété n'est pas exclue.

II. Observations cliniques non respiratoires intéressantes

II-1. Effet lignée

Une des impressions cliniques qui est ressortie au cours de notre expérience est que certaines lignées de clones semblent plus problématiques que d'autres et que certains veaux de la même lignée avaient le même patron d'évolution clinique. En effet, l'exemple de la cohorte 4 (annexe 2) montre comment à partir du même nombre

d'embryons implantés, une lignée a produit 2 veaux clonés nés vivants tandis que l'autre a produit 6 veaux nés vivants. De plus les 2 veaux de la même lignée ont tous les deux eu besoin d'être mis sous respirateur à la naissance et le sont restés ensuite tandis que 5 des 6 représentants de l'autre lignée se sont comportés quasiment de la même façon (l'un a été euthanasié à la naissance à cause de malformations myo-arthro-squelettiques). Ils ont eu un comportement normal à la naissance puis sont devenus anorexiques autour de 48h d'âge, en même temps de l'hypoxémie a été diagnostiquée sur 2 individus pour lesquels une analyse de gaz artériels étaient disponibles. De plus, ils ont tous répondu rapidement à l'oxygénothérapie intranasale en retrouvant leur appétit et sont restés entre 3 et 4 jours sous oxygène. L'observation est anecdotique et le petit nombre d'individus par lignée ne nous a pas permis d'aller plus loin dans nos hypothèses, mais cela reste intéressant à noter.

II-2. Alimentation d'un veau critique

Cette étude nous a également permis de réfléchir à la façon optimale d'alimenter un veau en soins intensifs. En effet certains des veaux clonés étaient très abattus et faibles : ils avaient du mal à tenir leur tête et étaient également anorexiques. L'alimentation était problématique car on devait prévenir les fausses déglutitions d'une part et combler leurs apports énergétiques et protéiques d'autre part. Nos réflexions ont conduit à bâtir l'arbre décisionnel des annexes 3 et 4. Nos objectifs étaient que le veau reçoive 2,5% de son poids en colostrum avant 6h d'âge et 10% avant 24 heures d'âge. Si la quantité optimale de colostrum n'a pu être distribuée et/ou que les solides totaux restaient en dessous de 55g/L, alors nous avons recours

au plasma. Les problèmes d'alimentation ont continué par après ce qui nous a conduit à réajuster l'alimentation illustré par l'arbre décisionnel en annexe 4. Notre attention étant sur la survie du veau en corrigeant ses problèmes respiratoires, l'alimentation peut être injustement négligée. Cependant les nouveau-nés ont très peu de réserves et les apports d'énergie et d'acides aminés par l'alimentation sont fondamentaux afin d'éviter un état catabolique. L'objectif de notre arbre décisionnel alimentaire était qu'un veau ne reste pas plus de 24h sans apports alimentaires. Le recours à l'alimentation parentérale permet de maintenir les apports en énergie et acides aminés nécessaires au veau dans les cas où l'anorexie est persistante (annexe 4).

II-3. Structures ombilicales

L'anomalie la plus fréquente chez les veaux clonés de cette étude est une taille augmentée des vaisseaux ombilicaux (annexe 5). Ce type d'anomalie est également rapporté chez 25 à 100% des veaux clonés dans les autres études ^{10,15,17}. Cette anomalie n'est pas sans conséquence pour la santé et la vie des veaux clonés. Dans cette étude, plus de la moitié des veaux vivants après leur période néonatale ont souffert d'une infection d'un ou plusieurs vestiges ombilicaux et 2 sont morts des complications associées. Certains auteurs mis en relation l'augmentation de la taille des vaisseaux ombilicaux avec les anomalies placentaires fréquemment observées lors de gestation de clones : augmentation de la taille des placentomes, modification de leur forme et diminution de leur nombre ¹⁷. Une autre hypothèse pour expliquer la forte incidence d'infections ombilicales pourrait être un système immunitaire inadéquat. Certaines de nos observations supportent cette hypothèse. La fréquence

des infections des vestiges ombilicaux est élevée alors que les veaux étaient maintenus dans un environnement propre et dans lequel les mouvements de personnel étaient limités. De plus, les ombilics étaient surveillés et traités aux 4 heures et certains veaux ont reçus une antibiothérapie préventive.

La littérature rapportent des cas d'aplasie thymique^{8,158}, et d'insuffisance immunitaire¹⁵⁹ chez des veaux clonés. Une étude récente ne met en évidence aucune différence entre la fonction immunitaire des clones et celle de témoins du même âge¹⁶⁰. Cependant il s'agissait de clones de 1 an en bonne santé. Ces animaux avaient passé la période critique d'avant sevrage au cours de laquelle on observe la plupart des pertes néonatales^{8,10} tandis que dans notre étude, les veaux étaient nouveau-nés. Un autre élément qui pourrait supporter l'hypothèse d'un système immunitaire immature est le comptage lymphocytaire diminué chez les clones à la naissance (voir annexe 5). Cependant les autres paramètres leucocytaires (comptage leucocytaire et neutrophilique) n'étaient pas différents de ceux des témoins. De plus, le transfert de l'immunité colostrale avait été efficace pour tous les veaux.

Lors de la césarienne, 2 techniques de rupture des cordons ombilicaux ont successivement étaient essayées au cours de cette étude. Au début de l'étude les cordons étaient rupturés manuellement par élongation de façon à mimer ce qui se passe lors d'un vêlage afin de réaliser l'hémostase. Avec cette technique les vaisseaux ombilicaux se rupturaient à moins de 3 cm de la paroi abdominale et certains ont saigné de nouveau après la naissance. Une seconde technique a alors été développée. Elle consistait à placer plusieurs attaches en plastiques auto-serrantes stériles autour des vaisseaux ombilicaux avant des les sectionner au scalpel. Avec cette technique les

ombilics mesuraient entre 7 et 10 cm et ne se sont pas rétractés dans l'abdomen. De plus du sang s'est accumulé dans les vestiges des vaisseaux ombilicaux et a servi de milieu de culture. L'incidence des saignements a diminué mais celle des infections augmenté. Une 3^{ème} alternative pourrait être de reséquer et suturer chirurgicalement l'ombilic externe lors de la naissance. Une fois le veau extériorisé, les vaisseaux ombilicaux seraient ligaturés par une attache plastique auto-serrante à 5 cm de l'abdomen afin de contrôler l'hémorragie. Par la suite, on placerait d'autres ligatures plus proximal, les ligatures distales seraient alors coupées et le sang évacué. Ainsi on prévient les saignements et on diminue les risques d'infection dus au sang accumulé. Cependant cette technique est plus longue et nécessite le maintien d'un environnement stérile autour du veau nouveau-né le temps de l'intervention. De plus elle retarde les interventions de stimulation du veau nouveau-né à prendre sa première respiration. Elle ne pourrait être envisagée que sur des animaux assez stables pour être maintenu en décubitus latéral pour 5 min à la naissance. Une autre solution pourrait être de reséquer les vestiges ombilicaux dans les heures suivants la naissance, une fois que le veau est stabilisé, sous sédation légère et anesthésie locale, par exemple en même temps que l'installation d'un cathéter veineux long terme stérile et le cas échéant d'un cathéter artériel auriculaire.

II-4. Anomalies hématologiques

Les veaux clonés de cette étude présentaient des anomalies hématologiques à la naissance par rapport aux valeurs de référence ^{161,162}. L'anomalie la plus marquée était l'anémie. Leur comptage érythrocytaire, leur taux d'hémoglobine et leur

hématocrite étaient inférieurs à ceux de veaux nouveaux nés issus de fécondation naturelle ¹⁶². Une étude précédente ¹⁶ avait comparé les valeurs hématologiques de 8 veaux clonés avec autant de veaux témoins issus de transfert embryonnaire. Ils avaient constaté que le comptage érythrocytaire et l'hématocrite étaient significativement inférieurs à ceux des témoins gardés dans les mêmes conditions. Une autre étude a rapporté les mêmes observations ⁸.

De l'anémie est rapportée chez le veau nouveau-né ¹⁶³. Les mécanismes proposés pour expliquer cette anémie sont une expansion du volume vasculaire à la suite de la prise colostrale, une diminution de la production d'érythrocytes par la moelle osseuse en réponse à l'augmentation de l'oxygène dans le sang au moment de la naissance, une destruction des érythrocytes fœtaux, ou une déficience en fer et/ou en érythropoïétine ¹⁶¹. La plupart de ces mécanismes ne peuvent pas expliquer complètement que les veaux clonés de notre étude soient plus anémiques que des veaux nouveau-nés normaux, d'autant plus que la prise de sang des veaux clonés a été faite avant le repas colostrale, donc avant l'expansion vasculaire qui lui est due. Une perte de sang lors de la naissance pourrait contribuer à l'anémie observée. Les vaisseaux ombilicaux des veaux clonés étaient plus gros que normal. Cela a pu occasionner des saignements importants lors de la rupture ou de la section du cordon, même si des précautions avaient été prises. De plus on peut imaginer que, même en l'absence de saignements, la quantité de sang séquestrée dans les vaisseaux ombilicaux lors de leur section était assez importante, et probablement plus importante que chez des veaux normaux. Une déficience en fer pourrait également être une explication de l'anémie observée. Des déficits placentaires ont

précédemment été rapportés lors des gestations de veaux clonés^{13,17,152,164,165}. Il est possible que les besoins en fer du fœtus ne soient pas totalement comblés à cause d'un défaut de transfert placentaire. Malheureusement, les concentrations plasmatiques de fer et les valeurs de TIBC n'ont pas été évaluées chez les veaux clonés de cette étude. Il pourrait être intéressant de doser ces 2 paramètres chez les veaux clonés et leurs mères porteuses afin de s'assurer, le cas échéant, lesquels sont déficitaires. Si les mères et les veaux sont déficitaires, c'est probablement la régie des mères qu'il faudrait réviser. Si seuls les veaux sont déficitaires, il aurait été intéressant de doser le fer dans le foie des individus morts et mort-nés pour savoir si le déficit est chronique (tout au long de la gestation) et possiblement associé à une défaut de transfert placentaire.

Enfin, un effet de la technique de clonage ou de la lignée génétique ne peut pas être complètement exclue ou affirmée et serait une hypothèse d'exclusion difficile à démontrer dans l'état actuel de connaissances quant aux modifications génétiques et épigénétiques intervenant lors du processus de clonage.

II-5. Température

Quatre veaux clonés de cette étude ont eu des épisodes d'hyperthermie c'est à dire qu'ils présentaient une température corporelle supérieure à 40°C, ne rétrocedant pas à l'administration d'anti-inflammatoires et non associé avec un processus inflammatoire identifiable. L'origine de cette hyperthermie n'a pas pu être mise en évidence. L'environnement était tempéré et la ventilation efficace. Une autre équipe travaillant avec des veaux clonés a fait la même observation. Ils ont constaté que les

veaux clonés avaient une température corporelle supérieure à celle de veaux témoins contemporains, issus d'insémination artificielle ou de fécondation *in vitro*, élevés dans les mêmes conditions ⁷¹, et ce jusqu'à l'âge de 50 jours. De plus, au cours des trois premières semaines de vie, ces veaux clonés ont fait des pics de température, parfois jusqu'à 41°C, pendant 24 à 36h avant de se résoudre. Cette équipe a émis l'hypothèse d'un dérèglement de la fonction thyroïdienne. Ils ont dosé les hormones T4 et ont observé que les clones avaient une concentration en T4 inférieure à celle des témoins, ce qui ne semble pas aller dans le sens qu'une hyperthyroïdie serait responsable de l'augmentation de la température observée chez les veaux clonés.

Dans notre cas comme dans l'étude précédemment citée, l'hyperthermie s'est résolue spontanément. Une autre hypothèse pourrait être une sécrétion plus importante de catécholamines, et notamment de norépinephrine, chez les veaux clonés, qui stimulerait de façon exagérée la production d'énergie par le tissu adipeux brun et par les tremblements musculaires. L'équipe de l'étude précédemment citée a mesuré les catécholamines urinaires chez des veaux clonés et des témoins sans mettre en évidence de différence ¹⁶⁶. Cependant l'étude a été faite sur les animaux âgés de 4 à 18 mois, donc plus tard que la période où de l'hyperthermie a été observée. Une autre hypothèse pourrait être que la quantité ou la sensibilité des tissus adipeux bruns des clones est différente de celle des témoins. Il est déjà rapporté que différentes sous espèces de bovins n'avaient pas les mêmes caractéristiques relatives au tissu adipeux brun. Ainsi les veaux nouveau-nés *Bos indicus* serait plus sensibles au froid que les *Bos taurus*, parce qu'ils naissent plus légers et auraient moins de tissus adipeux brun ¹⁶⁷. De plus ces veaux ont parallèlement une concentration en hormone thyroïdienne

T4 supérieure au *Bos Taurus*. On pourrait donc formuler l'hypothèse suivante : les veaux clonés naissent plus lourds que les veaux témoins, leur quantité de tissu adipeux brun est plus grande et leur thermogénèse est plus intense en réponse à des stimuli normaux. Parallèlement, les hormones thyroïdiennes seraient moins stimulées, ce qui pourrait aller dans le sens de l'observation précédemment ⁷¹.

II-6. Complications digestives post période néonatale

Un certain nombre de complications digestives ont été observées chez les veaux clonés après la période néonatale. Trois veaux ont souffert d'indigestion chronique causant des ballonnements récurrents vers l'âge de 2 mois. Ils ont été traités chirurgicalement par l'ouverture d'une fistule ruminale. Deux autres veaux ont développé des ulcères de la caillette à l'âge respectif de 3 semaines et 1 mois ½. Ils sont morts, avant l'âge de 3 mois, suite à une péritonite due à la perforation d'un des ulcères. Enfin, d'autres atteintes digestives telles que des entérites néonatales (n=3), une intussusception et un déplacement de caillette, ont été diagnostiquées et traitées avec succès avant l'âge de 3 mois.

La fréquence importante des problèmes digestifs en jeune âge pourrait être en rapport avec la taille des veaux clonés. En effet, ils étaient beaucoup plus gros que des veaux normaux du même âge. De fait leur alimentation a nécessité des adaptations telles que les quantités de lait par repas et par jour. Une inadéquation entre la taille et l'âge des animaux a pu être à l'origine d'erreur de régulation, notamment lors du sevrage des animaux ce qui a pu en prédisposer certains au syndrome de maladaptation de la flore ruminale, responsable probablement des ballonnements

chroniques observés. Ceci reste une hypothèse mais souligne le fait que même si certains veaux clonés ont la physionomie (poids et conformation) de veaux beaucoup plus vieux, il est important d'adapter la quantité de lait distribuée à leur poids mais d'adapter la régie de sevrage à leur âge.

III. Et si c'était à refaire...

III-1. Logistique

La prise en charge des ces veaux clonés en période néonatale a été une expérience extraordinaire nécessitant planification, personnels qualifiés, et instruments médicaux spécialisés.

III-1-1. Moyens matériels

Une salle a été complètement dédiée et aménagée pour accueillir jusqu'à 8 nouveau-nés en soins intensifs simultanément. Chaque veau avait un box individuel et la possibilité de recevoir de l'oxygène intranasal, des fluides et d'être réchauffé. Des mesures sanitaires ont été installées pour entrer dans la salle et pour entrer dans chaque box. La circulation des personnes était limitée et le personnel soignant (vétérinaires et techniciens) était dédié aux veaux clonés. Chaque veau avait également son matériel de traitement.

Pour assurer la ventilation mécanique, un respirateur a été exclusivement dédié aux veaux durant chaque session de cette étude. De plus, la proximité du laboratoire et des installations d'imagerie ont permis de limiter les durées de transfert tant des analyses que des animaux.

III-1-2. Moyens personnels

Une équipe vétérinaire multidisciplinaire a été mise en place et a acquis de l'expérience au fil des cohortes. Elle incluait des spécialistes de médecine interne, chirurgie, soins intensifs, radiologie et pathologie le cas échéant.

Une surveillance 24/24 a également été mise en place afin d'assurer le meilleur suivi des patients et de leur assurer un confort optimal.

III-1-3. Les apprentissages retenus

Cette expérience a permis de développer, adapter et améliorer des techniques moins utilisées en médecine des ruminants : oxygénothérapie, ventilation mécanique, nutrition parentérale, analyses des gaz sanguins en série. L'équipe a acquis de l'expertise à prendre en charge des veaux nouveau-nés avec des problèmes respiratoires sévères, et à utiliser des ressources humaines et matériels inhabituelles.

III-2. Éthique

Lorsqu'on fait le point sur la santé des veaux clonés en période néonatale, on peut se questionner sur le bien-fondé du clonage bovin. Au-delà des opportunités offertes par le clonage somatique (voir revue de littérature), on se doit de constater que la période néonatale des veaux clonés est difficile et que des moyens hors du commun peuvent être nécessaires pour les garder en vie. Cela représente probablement un facteur limitant important à l'implantation du clonage comme technique de reproduction.

Cependant les observations faites chez les veaux clonés ont été importantes dans la compréhension des anomalies de développement de ces animaux et constituent des informations précieuses pour la recherche fondamentale.

Si le clonage somatique est un outil de recherche fondamentale important permettant d'étudier les mécanismes du développement d'un organisme, il est présentement illusoire de vouloir l'implanter comme technique de reproduction au même titre que la fécondation *in vitro*. Une compréhension accrue du développement anormal cellulaire et fœtal des clones permettra peut être un jour d'utiliser de façon routinière.

Conclusion

Cette étude rétrospective a montré que l'incidence des problèmes respiratoires est élevée chez les veaux clonés. Il est plausible que plus d'une maladie affectent les veaux clonés et les causes exactes des problèmes respiratoires demeurent hypothétiques. Un retard de résorption du fluide pulmonaire, une hypertension pulmonaire persistante ou une déficience de surfactant figurent parmi les entités pathologiques les plus probables. Il est cependant possible de traiter avec succès ces veaux en utilisant des traitements comme l'oxygénothérapie et la ventilation mécanique et des techniques de suivi comme l'analyse des gaz sanguins artériels et la radiographie.

De plus, cette étude a montré que la morbidité générale est élevée chez les veaux clonés. Le nombre d'animaux totalement normaux est faible et les veaux clonés semblent plus sensibles aux infections. L'origine de ces anomalies n'a pas encore été complètement résolue mais il semble que la technique de clonage puisse avoir des conséquences cliniques et subcliniques. Dans notre étude les anomalies les plus fréquentes étaient une taille importante des vaisseaux ombilicaux associée à une forte incidence de complications, de l'anorexie et des insuffisances respiratoires. Cependant une prise en charge précoce permet de limiter la mortalité chez les veaux clonés en période néonatale. Ces animaux doivent être surveillés attentivement afin d'intervenir précocement lorsqu'un problème est identifié.

Bibliographie

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
2. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 1999;60:996-1005.
3. Edwards JL, Schrick FN, McCracken MD, van Amstel SR, Hopkins FM, Welborn MG, Davies CJ. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:113-123.
4. Salomone D, Baranao L, Bussmann L, Artuso J. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone into the milk of a cloned transgenic cow. *Theriogenology* 2006;124:469-472.
5. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:369-378.
6. Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, Oback B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells* 2004;6:101-110.
7. Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Renard JP. [Cloning and associated physiopathology of gestation]. *Gynecol Obstet Fertil* 2000;28:633-642.
8. Chavatte-Palmer P, Remy D, Cordonnier N, Richard C, Issenman H, Laigre P, Heyman Y, Mialot JP. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells* 2004;6:94-100.
9. Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 2000;120:231-237.
10. Panarace M, Agüero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cane L, Gutierrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Forte Pontes JE, Ereno Junio JC, Mower S, Medina M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 2007;67:142-151.
11. Pace MM, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsberg EJ, Golueke PJ, Graber DF, Kemper JC, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pfister-Genskow M, Strelchenko NS, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod* 2002;67:334-339.
12. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2002;419:583-586.
13. Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 1999;51:1451-1465.
14. Wilson JM, Williams JD, Bondioli KR, Looney CR, Westhusin ME. Comparison of birth and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim Reprod Sci* 1995;38:73-83.
15. Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 1996;45:141-152.

16. Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. *Cloning Stem Cells* 2007;9:83-96.
17. Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. *Cloning Stem Cells* 2007;9:63-82.
18. Foote RH. Historical perspective. In: Cibelli JB, ed. *Principles of cloning* 2002:3-18.
19. Ozil JP, Heyman Y, Renard JP. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet Rec* 1982;110:126-127.
20. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
21. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998;394:369-374.
22. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato JY, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998;282:2095-2098.
23. Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo - assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction* 1987;37:859-866.
24. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction* 1999;60:996-1005.
25. Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000;120:231-237.
26. Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. A cloned horse born to its dam twin - A birth announcement calls for a rethink on the immunological demands of pregnancy. *Nature* 2003;424:635-635.
27. Reggio BC, James AN, Green HL, Gavin WG, Behboodi E, Echelard Y, Godke RA. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: Oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biology of Reproduction* 2001;65:1528-1533.
28. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai YF, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000;407:86-90.
29. Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology* 2002;20:366-369.
30. Yin XJ, Lee HS, Lee YH, Seo YI, Jeon SJ, Choi EG, Cho SJ, Cho SG, Min W, Kang SK, Hwang WS, Kong IK. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* 2005;129:245-249.

31. Jang G, Hong SG, Oh HJ, Kim MK, Park JE, Kim HJ, Kim DY, Lee BC. A cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog. *Theriogenology* 2008;69:556-563.
32. Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002;415:1035-1038.
33. Cozzi J, Wang E, Jacquet C, Fraichard A, Cherifi Y, Zhou Q. Procedures for Somatic Cell Nuclear Transfer in the Rat. *Rat Genomics: Methods and Protocols*:137-150.
34. Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning and Stem Cells* 2007;9:130-137.
35. Oh HJ, Kim MK, Jang G, Kim HJ, Hong SG, Park JE, Park K, Park C, Sohn SH, Kim DY, Shin NS, Lee BC. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology* 2008;70:638-647.
36. Biggers JD. The potential use of artificially produced monozygotic twins for comparative experiments. *Theriogenology* 1986;26:1-25.
37. Stice SL. Current research and commercial applications of cloning technology. In: Cibelli JB, ed. *Principles of cloning* 2002:443-457.
38. Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2000;2:79-90.
39. Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reproduction Fertility and Development* 1998;10:369-378.
40. Salamone D, Baranao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, Prync A, Carbonetto C, Dabsys S, Munar C, Salaberry R, Berra G, Berra I, Fernandez N, Papouchado M, Foti M, Judewicz N, Mujica I, Munoz L, Alvarez SF, Gonzalez E, Zimmermann J, Criscuolo M, Melo C. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *Journal of Biotechnology* 2006;124:469-472.
41. Edwards JL, Schrick FN, McCracken MD, van Amstel SR, Hopkins FM, Welborn MG, Davies CJ. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *American Journal of Reproductive Immunology* 2003;50:113-123.
42. Bruggerhoff K, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Prella K, Scherthaner W, Alberio R, Kuchenhoff H, Stojkovic M, Brem G, Hiendleder S, Wolf E. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: Effect of maternal lineage of oocyte donors. *Biology of Reproduction* 2002;66:367-373.
43. Kishi M, Itagaki Y, Takakura R, Imamura M, Sudo T, Yoshinari M, Tanimoto M, Yasue H, Kashima N. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial, cells and ear-derived fibroblast cells. *Theriogenology* 2000;54:675-684.
44. Panarace M, Aguero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cane L, Gutierrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Pontes JEF, Junio

JCE, Mower S, Medina M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 2007;67:142-151.

45. Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef-cattle *Journal of Reproduction and Fertility* 1988;84:437-446.

46. Kruip TAM, denDaas JHG. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 1997;47:43-52.

47. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology of Reproduction* 2002;66:6-13.

48. Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA, Butler JE, Hamilton WC. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific-protein in serum of cows and profile of serum concentrations during gestation. *Biology of Reproduction* 1986;35:936-942.

49. Mialon MM, Camous S, Renand G, Martal J, Menissier F. Peripheral concentrations of 60-kDa pregnancy serum-protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 1993;33:269-282.

50. Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers JF. Radioimmunoassay of bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum - its application for pregnancy diagnosis. *Biology of Reproduction* 1992;46:83-92.

51. Forsyth JT, Wells DN. Health and neonatal care of bovine clones. *Nuclear Transfer Protocols: Cell Reprogramming and Transgenesis* 2006;348:91-108.

52. Pace MM, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsberg EJ, Golueke PJ, Graber DF, Kemper JC, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pfister-Genskow M, Strelchenko NS, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biology of Reproduction* 2002;67:334-339.

53. Hasler JF. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology* 2006;65:4-16.

54. Vishwanath R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 2003;59:571-584.

55. Alexander BM, Johnson MS, Guardia RO, Vandegraaf WL, Senger PL, Sasser RG. Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. *Theriogenology* 1995;43:551-556.

56. Romano JE, Thompson JA, Kraemer DC, Westhusin ME, Forrest DW, Tomaszewski MA. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology* 2007;67:486-493.

57. Wilmut I, Sales DI, Ashworth CJ. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility* 1986;76:851-864.

58. Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biology of Reproduction* 2000;63:1787-1794.

59. De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK, Wilmut I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biology of Reproduction* 2001;65:23-30.
60. Hill JR, Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biology of Reproduction* 2002;67:55-63.
61. Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvao KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science* 2004;82-3:513-535.
62. Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Animal Reproduction Science* 2000;60:145-160.
63. Robinson JS, Kingston EJ, Jones CT, Thorburn GD. Studies on experimental growth retardation in sheep : the effect of removal endometrial caruncles on fetal size and metabolism. *Journal of Developmental Physiology (Eynsham)* 1979;1:379-398.
64. Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, Oback B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning and Stem Cells* 2004;6:101-110.
65. Zakhartchenko V, Mueller S, Alberio R, Schernthaner WG, Stojkovic M, Wenigerkind H, Wanke R, Lassnig C, Mueller M, Wolf E, Brem G. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. *Molecular Reproduction and Development* 2001;60:362-369.
66. Wilson JM, Williams JD, Bondioli KR, Looney CR, Westhusin ME, McCalla DF. Comparison of birth-weight and growth-characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science* 1995;38:73-83.
67. Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 1996;45:141-152.
68. Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 1999;51:1451-1465.
69. Patterson DJ, Bellows RA, Burfening PJ, Carr JB. Occurrence of neonatal and postnatal mortality in range beef cattle. I. Calf loss incidence from birth to weaning, backward and breech presentations and effects of calf loss on subsequent pregnancy rate of dams. *Theriogenology* 1987;28:557-571.
70. Renard JP, Chastant S, Chesne P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 1999;353:1489-1491.
71. Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biology of Reproduction* 2002;66:1596-1603.
72. Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned

and normal calves: Physical and clinical characteristics. *Cloning and Stem Cells* 2007;9:63-82.

73. Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves: Hematologic and biochemical profiles. *Cloning and Stem Cells* 2007;9:83-96.

74. Kertz AF, Reutzler LF, Barton BA, Ely RL. Body weight, body condition score, and wither height of prepartum Holstein cows and birth weight and sex of calves by parity: a database and summary. *J Dairy Sci* 1997;80:525-529.

75. Cunningham JG, Klein BG. *Textbook of veterinary physiology*, 4th edSaunders; 2007.

76. Jain L, Dudell GG. Respiratory transition in infants delivered by cesarean section. *Seminars in Perinatology* 2006;30:296-304.

77. Kasari TR. Physiological mechanisms of adaptation in the fetal calf at birth. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 1994;10:127-136.

78. Dufty JH, Sloss V. Anoxia in bovine fetus. *Australian Veterinary Journal* 1977;53:262-267.

79. Comline RS, Silver M. Some aspects of fetal and uteroplacental metabolism in cow with indwelling umbilical and uterine vascular catheters. *Journal of Physiology-London* 1976;260:571-586.

80. Stenmark KR, Durmowicz AG, Roby JD, Mecham RP, Parks WC. Persistence of the fetal pattern of tropoelastin gene-expression in severe neonatal bovine pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 1994;93:1234-1242.

81. Stiebellehner L, Belknap JK, Ensley B, Tucker A, Orton EC, Reeves JT, Stenmark KR. Lung endothelial cell proliferation in normal and pulmonary hypertensive neonatal calves. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 1998;275:L593-L600.

82. Clifton-Koeppel R. *Respiratory Review*. *Newborn and Infant Nursing Reviews* 2006;6:52-56.

83. Kitterman JA, Ballard PL, Clements JA, Mescher EJ, Tooley WH. Tracheal fluid in fetal lambs - spontaneous decrease to birth. *Journal of Applied Physiology* 1979;47:985-989.

84. Bland RD. Dynamics of pulmonary water before and after birth. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1983;305:12-20.

85. Berger PJ, Smolich JJ, Ramsden CA, Walker AM. Effect of lung liquid volume on respiratory performance after Caesarean delivery in the lamb. *Journal of Physiology-London* 1996;492:905-912.

86. Stoll BJ, Kliegman RM. Nervous system disorders. In: *Nelson Textbook of Pediatrics*, 17th edSaunders; 2004.

87. Randall GC. Perinatal mortality: some problems of adaptation at birth. *Adv Vet Sci Comp Med* 1978;22:53-81.

88. Vestweber JG. Respiratory problems of newborn calves. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 1997;13:411-&.

89. Stoll BJ, Kliegman RM. Respiratory Tract Disorders. In: *Nelson Textbook of Pediatrics*Saunders; 2004.

90. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, 11th edSaunders; 2007.

91. Mescher EJ, Platzker ACG, Ballard PL, Kitterman JA, Clements JA, Tooley WH. Ontogeny of tracheal fluid, pulmonary surfactant, and plasma corticoids in fetal lambs. *Journal of Applied Physiology* 1975;39:1017-1021.
92. Eigenmann UJE, Schoon HA, Jahn D, Grunert E. Neonatal respiratory-distress syndrome in the calf. *Veterinary Record* 1984;114:141-144.
93. Stallman MT. Acute respiratory disorders in the newborn. In: Avery's Neonatology Lippincott Company; 1975:221.
94. Bleul U. Respiratory distress syndrome in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2009;25:179-193.
95. Bleul U, Kahn W. Monitoring the bovine fetus during stage II of parturition using pulse oximetry. *Theriogenology* 2008;69:302-311.
96. Farrell PM, Avery ME. Hyaline-membrane disease. *American Review of Respiratory Disease* 1975;111:657-688.
97. Palmer JE. Ventilatory support of the critically ill foal. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 2005;21:457-+.
98. Dunphy ED, Mann FA, Dodam JR, Branson KR, Wagner-Mann CC, Johnson PA, Brady MA. Comparison of unilateral versus bilateral nasal catheters for oxygen administration in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2002;12:245-251.
99. Block MF, Kling OR, Crosby WM. Antenatal glucocorticoid therapy for the prevention of respiratory distress syndrome in the premature infant. *Obstet Gynecol* 1977;50:186-190.
100. Zaremba W, Grunert E, Aurich JE. Prophylaxis of respiratory distress syndrome in premature calves by administration of dexamethasone or a prostaglandin F2 alpha analogue to their dams before parturition. *Am J Vet Res* 1997;58:404-407.
101. Stoll BJ. The Newborn Infant. In: Kliegman R, ed. *Nelson Textbook of Pediatrics*, 18th ed Saunders; 2007.
102. Stoll B, Kliegman R. Respiratory tract disorders. In: Saunders, ed. *Nelson textbook of pediatrics* 2007.
103. Guglani L, Lakshminrusimha S, Ryan RM. Transient tachypnea of the newborn. *Pediatr Rev* 2008;29:e59-65.
104. Wilkins PA. Lower respiratory problems of the neonate. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2003;19:19-33, v.
105. Miller RB. Summary of some of pathogenic mechanisms involved in bovine abortion. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 1977;18:87-95.
106. Cleary GM, Wiswell TE. Meconium-stained amniotic fluid and the meconium aspiration syndrome - An update. *Pediatric Clinics of North America* 1998;45:511-+.
107. Dargaville PA, South M, McDougall PN. Surfactant and surfactant inhibitors in meconium aspiration syndrome. *Journal of Pediatrics* 2001;138:113-115.
108. Lam BC, Yeung CY. Surfactant lavage for meconium aspiration syndrome: a pilot study. *Pediatrics* 1999;103:1014-1018.
109. Lista G, Bianchi S, Castoldi F, Fontana P, Cavigioli F. Bronchoalveolar lavage with diluted porcine surfactant in mechanically ventilated term infants with meconium aspiration syndrome. *Clinical Drug Investigation* 2006;26:13-19.
110. Steinhorn RH, Farrow KN. Pulmonary Hypertension in the Neonate. *Neoreviews* 2007;8:e14-21.

111. Steinhorn RH, Farrow KN. Pulmonary hypertension in the neonate. In: *NeoReviews*2007:e14-e21.
112. Frankel LR, DiCario JV. Acute respiratory distress syndrome (ARDS). In: *Nelson Textbook of Pediatrics*Saunders; 2004.
113. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R, Cochlin B, Lanke PN, Leeper KV, Marini J, Murray JF, Oppenheimer L, Pesenti A, Reid L, Rinaldo J, Villar J, Vanasbeck BS, Dhainaut JF, Mancebo J, Matthay M, Meyrick B, Payen D, Perret C, Fowler AA, Schaller MD, Hudson LD, Hyers T, Knaus W, Matthay R, Pinsky M, Bone RC, Bosken C, Johanson WG, Lewandowski K, Repine J, Rodriguezroisin R, Roussos C, Antonelli MA, Beloucif S, Bihari D, Burchardi H, Lemaire F, Montravers P, Petty TL, Robotham J, Zapol W. The american-european consensus conference on ARDS - Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical-trial coordination. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1994;149:818-824.
114. Luh SP, Chiang CH. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;8:60-69.
115. Tomaszewski JF, Jr. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990;11:593-619.
116. West JB. *Respiratory Physiology* 8th ed. Baltimore: 2008.
117. Terra RL. Ruminant history, physical examination and records. In: Smith B, ed. *Large Animal Internal Medicine*Saunders; 2008.
118. Wilson WD, Lofstedt L. Alterations in respiratory function. In: Smith B, ed. *Large Animal Internal Medicine*Saunders; 2008.
119. Stöber M. Examen spécial de l'appareil respiratoire In: Rosenberger, ed. *Examen clinique des bovins le point vétérinaire*; 1979.
120. Sweeney CR, Baker JC. Diseases of the respiratory system. In: Smith B, ed. *Large Animal Internal Medicine*Saunders; 2008.
121. Adams R, Holland MD, Aldridge B, Garry FB, Odde KG. Arterial blood-sample collection from the newborn calf *Veterinary Research Communications* 1991;15:387-394.
122. Fisher EW, Sibartie D, Grimshaw WTR. A comparison of the pH, PCO₂, PO₂ and total CO₂ content in blood from the brachial and caudal auricular arteries in normal cattle. *British Veterinary Journal* 1980;136:496-&.
123. Bleul U, Lejeune B, Schwantag S, Kahn W. Blood gas and acid-base analysis of arterial blood in 57 newborn calves. *Veterinary Record* 2007;161:688-691.
124. Nagy O, Kovac G, Seidel H, Weissova T. The effect of arterial blood sampling sites on blood gases and acid-base balance parameters in calves. *Acta Veterinaria Hungarica* 2001;49:331-340.
125. Adams R, Garry FB, Aldridge BM, Holland MD, Odde KG. Physiological difference between twin and single born beef-calves in the first 2 days of life. *Cornell Veterinarian* 1993;83:13-29.
126. Varga J, Mester L, Borzsonyi L, Erdesz C, Vari A, Kormoczi PS, Szenci O. Adaptation of respiration to extrauterine-life in healthy newborn calves. *Reproduction in Domestic Animals* 1999;34:377-379.

127. Lester LA. Oxygen therapy. In: Hilman, ed. Pediatric respiratory diseaseSaunders; 1993.
128. Pang DS, Boysena S. Lactate in veterinary critical care: Pathophysiology and management. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2007;43:270-279.
129. Carlson GP. Clinical Chemistry Tests. In: P. SB, ed. *Large Animal Internal Medicine*. Saint Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2009:375 - 397.
130. Gunes V, Atalan G. Comparison of ventral coccygeal arterial and jugular venous blood samples for pH, PCO₂, HCO₃, Be-ecf and ctCO(2) values in calves with pulmonary diseases. *Research in Veterinary Science* 2006;81:148-151.
131. Koterba AM, House JK, Madigan JE. Manifestations of disease in the neonate In: Smith B, ed. *Large Animal Internal Medicine*Saunders; 2008.
132. West JB. *Pulmonary pathophysiology*, 7th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams &Wilkins; 2008;199.
133. Bleul UT, Bircher BM, Kahn WK. Effect of intranasal oxygen administration on blood gas variables and outcome in neonatal calves with respiratory distress syndrome: 20 cases (2004-2006). *J Am Vet Med Assoc* 2008;233:289-293.
134. Hasinski TA, Kennedy KA. Pulmonary oxygen toxicity. In: Hilman, ed. *pediatric respiratory disease*Saunders; 1993.
135. Tinitis P. Oxygen therapy and oxygen toxicity. *Annals of Emergency Medicine* 1983;12:321-328.
136. Verbrugge SJC, Lachmann B, Kesecioglu J. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application. *Clinical Physiology and Functional Imaging* 2007;27:67-90.
137. West JB. *Respiratory physiology : the essentials*, 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer|Lippincott Williams & Wilkins; 2008;ix, 186.
138. Bleul U, Lejeune B, Schwantag S, Kahn W. Blood gas and acid-base analysis of arterial blood in 57 newborn calves. *Vet Rec* 2007;161:688-691.
139. House JK. Initial Management and Physical Examination of the Neonate. In: Smith BP, ed. *Large Animal Internal Medicine*. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2009:262-280.
140. Wilson WD, Lofstedt J. Alterations in Respiratory Function. In: Smith BP, ed. *Large Animal Internal Medicine*, 4th ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2009:42-82.
141. Buczinski S, Boysen SR, Fecteau G. Mechanical ventilation of a cloned calf in respiratory failure. *J Vet Emerg Crit Care* 2007;17:179-183.
142. Fasules JW, Tryka F, Chipman CW, Van Devanter SH. Pulmonary hypertension and arterial changes in calves with a systemic-to-left pulmonary artery connection. *J Appl Physiol* 1994;77:867-875.
143. Stenmark KR, Fasules J, Hyde DM, Voelkel NF, Henson J, Tucker A, Wilson H, Reeves JT. Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4,300 m. *J Appl Physiol* 1987;62:821-830.
144. Sundell H, Garrott J, Blankenship WJ, Shepard FM, Stahlman MT. Studies on infants with type II respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1971;78:754-764.

145. Eigenmann UJ, Schoon HA, Jahn D, Grunert E. Neonatal respiratory distress syndrome in the calf. *Vet Rec* 1984;114:141-144.
146. Zimmermann LJ, Janssen DJ, Tibboel D, Hamvas A, Carnielli VP. Surfactant metabolism in the neonate. *Biol Neonate* 2005;87:296-307.
147. Corley KT, Axon JE. Resuscitation and emergency management for neonatal foals. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2005;21:431-455,.
148. Palmer JE. Ventilatory support of the critically ill foal. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2005;21:457-486, .
149. Lloyd KC, Kelly AB, Dunlop CI. Treatment of respiratory distress in a prematurely born foal. *J Am Vet Med Assoc* 1988;193:560-562.
150. Wilkins PA, Palmer JE. Mechanical ventilation in foals with botulism: 9 cases (1989-2002). *J Vet Intern Med* 2003;17:708-712.
151. Campos DB, Papa PC, Marques JE, Jr., Garbelotti F, Fatima LA, Artoni LP, Birgel EH, Jr., Meirelles FV, Buratini J, Jr., Leiser R, Pfarrer C. Somatic cell nuclear transfer is associated with altered expression of angiogenic factor systems in bovine placentomes at term. *Genet Mol Res* 2010;9:309-323.
152. Everts RE, Chavatte-Palmer P, Razzak A, Hue I, Green CA, Oliveira R, Vignon X, Rodriguez-Zas SL, Tian XC, Yang X, Renard JP, Lewin HA. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiol Genomics* 2008;33:65-77.
153. Arnold DR, Fortier AL, Lefebvre R, Miglino MA, Pfarrer C, Smith LC. Placental insufficiencies in cloned animals - a workshop report. *Placenta* 2008;29 Suppl A:S108-110.
154. Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau GA, von Der HH, Poets CF. Commercial versus native surfactants. Surface activity, molecular components, and the effect of calcium. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1524-1533.
155. Uystepuyst C, Coghe J, Dorts T, Harmegnies N, Delsemme MH, Art T, Lekeux P. Optimal timing of elective caesarean section in Belgian White and Blue breed of cattle: the calf's point of view. *Vet J* 2002;163:267-282.
156. Tasman W, Patz A, McNamara JA, Kaiser RS, Trese MT, Smith BT. Retinopathy of prematurity: the life of a lifetime disease. *Am J Ophthalmol* 2006;141:167-174.
157. Braunwald E. Hypoxia and cyanosis. In: Fauci, Longo, eds. *Harrison's principles of internal medicine* McGraw-Hill Companies, Inc; 2008:209-210.
158. Renard JP, Chastant S, Chesne P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* 1999;353:1489-1491.
159. Kubo M. Pathology of diseases in calves cloned by nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 2002:281.
160. Chavatte-Palmer PM, Heyman Y, Richard C, Urien C, Renard JP, Schwartz-Cornil I. The immune status of bovine somatic clones. *Cloning Stem Cells* 2009;11:309-318.
161. Adams R, Garry FB, Aldridge BM, Holland MD, Odde KG. Hematologic values in newborn beef calves. *Am J Vet Res* 1992;53:944-950.

162. Adams R, Garry FB, Aldridge BM, Holland MD, Odde KG. Physiologic differences between twin and single born beef calves in the first two days of life. *Cornell Vet* 1993;83:13-29.
163. Tennant B, Harrold D, Reina-Guerra M, Kendrick JW, Laben RC. Hematology of the neonatal calf: erythrocyte and leukocyte values of normal calves. *Cornell Vet* 1974;64:516-532.
164. Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 2002;66:1596-1603.
165. Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* 2006;75:122-130.
166. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Berthelot V, Fromentin G, Hocquette JF, Martignat L, Renard JP. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. *Theriogenology* 2007;67:134-141.
167. Carstens GE, Mostyn PM, Lammoglia MA, Vann RC, Apter RC, Randel RD. Genotypic effects on norepinephrine-induced changes in thermogenesis, metabolic hormones, and metabolites in newborn calves. *J Anim Sci* 1997;75:1746-1755.
168. Tyler JW, Hancock DD, Parish SM, Rea DE, Besser TE, Sanders SG, Wilson LK. Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves. *J Vet Intern Med* 1996;10:304-307.

Annexes

Annexe 1 : Résultats des gaz sanguins veineux obtenus moins de 10 minutes après la naissance, en l'absence de traitement.

a : référence d'après ¹²³ (n=57),

b : référence d'après ⁷⁸ (n=5),

c : référence d'après ¹²⁵ (n=30).

Moyenne (écart-type)	Clones (n=27)	clones de Garry et al. 1996 (n=28)	Références
pH	7,23 (0,09)	7,19 (0,14)	7,24 (0,09) a
PCO2 (mmHg)	70,6 (10,1)	60,1 (17,9)	67,3 (10,4) a
Lactate (mmol/L)	8,7 (2,2)	10,8 (6,3)	1,19 (0,63) b
Glycémie (mmol/L)	2,37 (0,66)	3,7 (1,9)	3,6 (1,2) c
HCO3- (mmol/L)	28,09 (3,53)	22,1 (4,8)	27,2 (3,7) a

Annexe 2 : Répartition des veaux clonés selon leur cohorte de naissance et leur lignée génétique

1. Lignée génétique (médiane, n=27 veaux nés vivants)

Lignées génétiques	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	total
cohorte 1	1	2	1								4
cohorte 2				3	4	1					8
cohorte 3					1	1					2
cohorte 4							6	2			8
cohorte 5									4	1	5
Total	1	2	1	3	5	2	6	2	4	1	27

2. Mortalité néonatale (0-14jours) (n=27 veaux nés vivants)

Lignées génétiques	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total
cohorte 1	0/1	1/2	0/1								1/4
cohorte 2				1/3	1/4	0/1					2/8
cohorte 3					0/1	0/1					0/2
cohorte 4							1/6	0/2			1/8
cohorte 5									2/4	0/1	2/5
Total	0/1	1/2	0/1	1/3	1/5	0/2	1/6	0/2	2/4	0/1	6/27

3. Mortalité juvénile (0-3mois) (n=27 veaux nés vivants)

Lignées génétiques	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total
cohorte 1	0/1	1/2	1/1								2/4
cohorte 2				1/3	1/4	0/1					2/8
cohorte 3					1/1	0/1					1/2
cohorte 4							2/6	0/2			2/8
cohorte 5									2/4	1/1	3/5
Total	0/1	1/2	1/1	1/3	2/5	0/2	2/6	0/2	2/4	1/1	10/27

4. Durée de gestation (médiane, n=27 veaux nés vivants)

Lignées génétiques	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Médiane
cohorte 1	274	272	274								273
cohorte 2				277	276	276					276
cohorte 3					273	273					273
cohorte 4							272	275			273
cohorte 5									271	273	271
Médiane	274	272	274	277	275	274	272	275	271	273	274

5. Poids de naissance (médiane, n=27 veaux nés vivants)

Lignées génétiques	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Médiane
cohorte 1	60	50	60								55
cohorte 2				51	59	56					56
cohorte 3					65	61					63
cohorte 4							52	53			52
cohorte 5									59	45	60
Médiane	60	50	60	51	60	58	52	53	59	45	56

6. Problèmes ombilicaux (n=25 veaux vivants après 1h d'âge)

Lignées génétiques	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	total
cohorte 1	0/1	0/2	0/1								0/4
cohorte 2				0/3	2/3	1/1					3/7
cohorte 3					1/1	1/1					2/2
cohorte 4							3/5	1/2			4/7
cohorte 5									2/4	1/1	3/5
Total	0/1	0/2	0/1	0/3	3/4	2/2	3/5	1/2	2/4	1/1	12/25

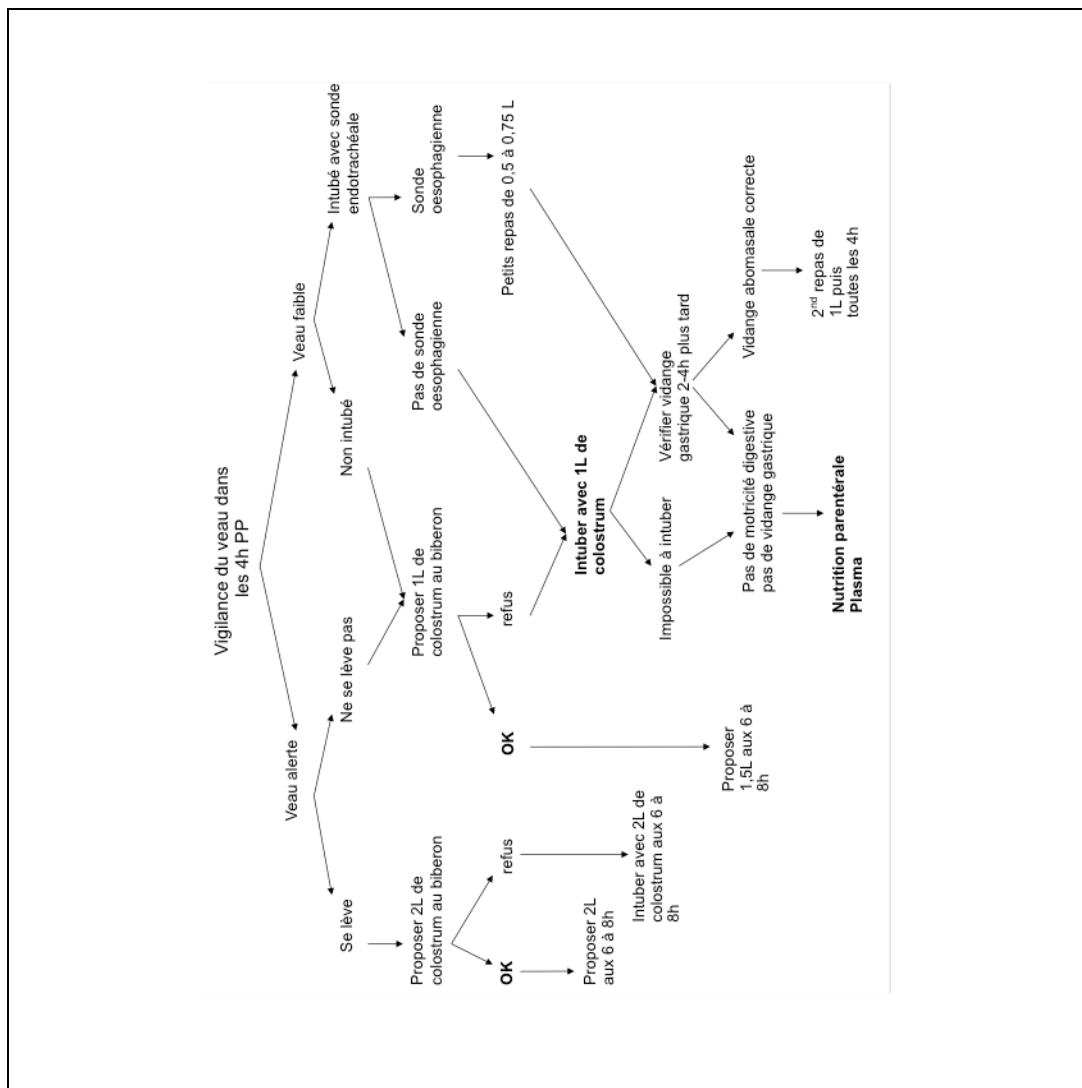
7. Problèmes respiratoires

Lignées génétiques	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	total
cohorte 1	1/1	1/2	1/1								3/4
cohorte 2				2/3	2/3	1/1					5/7
cohorte 3					1/1	1/1					2/2
cohorte 4							5/5	2/2			7/7
cohorte 5									4/4	1/1	5/5
Total	1/1	1/2	1/1	2/3	3/4	2/2	5/5	2/2	4/4	1/1	22/25

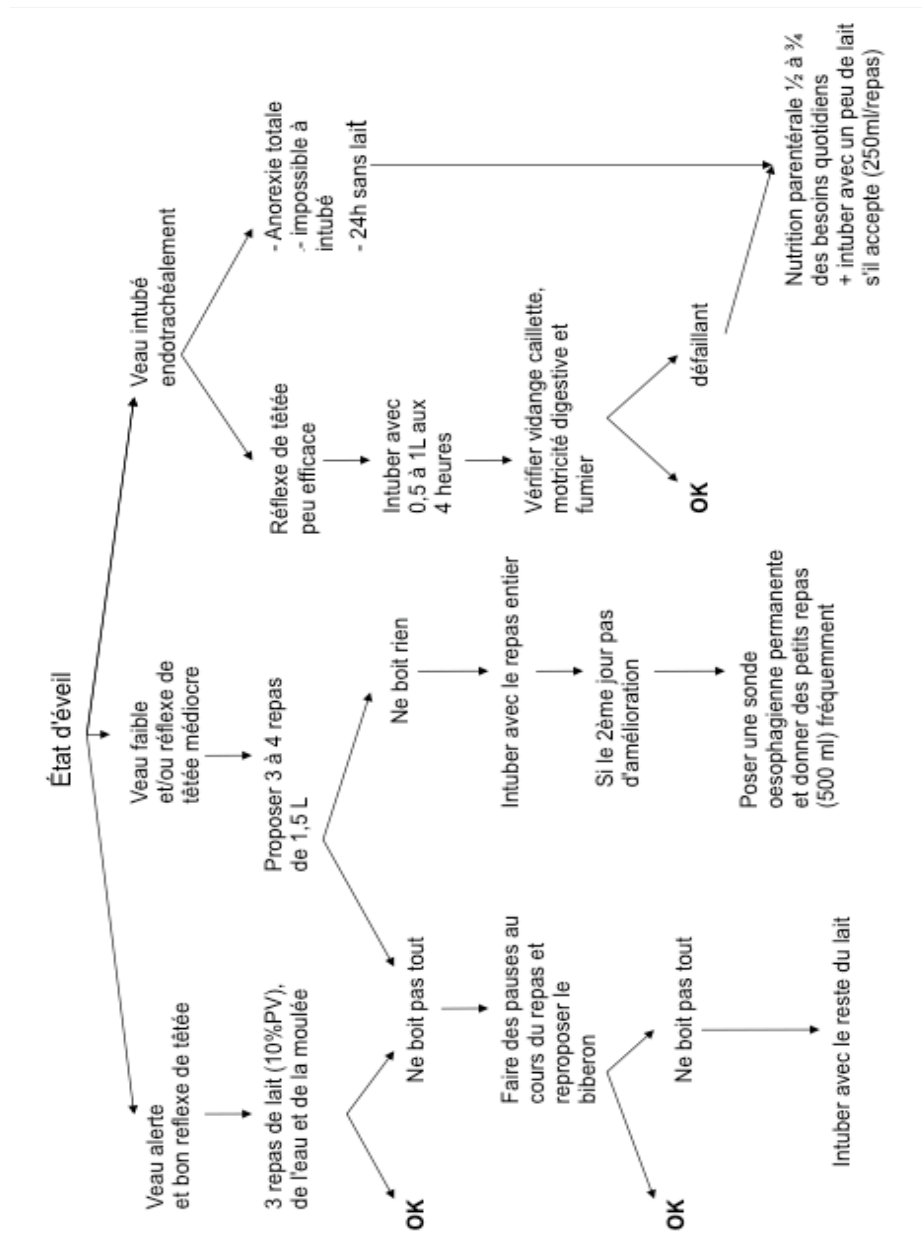
8. Veaux mis sous respirateur

Lignées génétiques	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	total
cohorte 1	0/1	1/2	1/1								2/4
cohorte 2				1/3	0/3	1/1					2/7
cohorte 3					0/1	0/1					0/2
cohorte 4							0/5	2/2			2/7
cohorte 5									3/4	0/1	3/5
Total	0/1	1/2	1/1	1/3	0/4	1/2	0/5	2/2	3/4	0/1	9/25

Annexe 3 : Arbre décisionnel pour l'administration du colostrum



Annexe 4 : Arbre décisionnel pour l'alimentation



Annexe 5 : Observations supplémentaires non respiratoires sur la santé des veaux clonés

1. Problèmes ombilicaux

Les cordons ombilicaux de 23 veaux clonés ont été jugés plus gros que la normale par les cliniciens en charge (pour 4 veaux, l'information relative à l'aspect du cordon ombilical n'était pas disponible). Pour 10 veaux, le cordon a été étiré manuellement par les chirurgiens pendant la césarienne. Avec cette technique, le cordon s'est rompu à moins de 3 cm de la paroi abdominale. Pour 13 autres veaux, le cordon ombilical a été ligaturé avec 2 attaches plastiques auto-serrantes stériles, puis un émasculateur a été posé sur le cordon ombilical avant qu'il ne soit sectionné au scalpel à 7 à 10 cm de l'abdomen. L'information sur le type de ligature du cordon ombilical n'était pas disponible pour 4 veaux. Trois veaux ont présenté un saignement ombilical dans les 6h *post partum*. Une attache plastique supplémentaire a été placée proximale aux précédentes.

Lorsque la technique des attaches auto-serrantes a été utilisée, une autre complication a été observée : pour 7/13 veaux, les vestiges ombilicaux ne se sont pas rétractés dans l'abdomen après leur section et les ombilics sont restés longs et humides. Des applications d'iode 5% toutes les 6h ont été nécessaires pendant plus de 36h afin de l'assécher.

Douze veaux ont développé une omphalite compliquée par une infection d'une ou plusieurs structures ombilicales internes. Le traitement de première intention a été médical avec l'administration d'antibiotiques. Onze veaux ont par la suite subi une chirurgie afin de réséquer les structures ombilicales infectées et le cas échéant une partie de la vessie (quatre veaux souffraient d'une infection du canal de l'ouraque). Une analyse bactériologique du contenu des structures infectées au site de résection était disponible pour 9 veaux. Elle a permis d'isoler différentes bactéries. Des complications secondaires ont été observées chez 7 veaux. Quatre veaux ont développé une infection et une déhiscence de la plaie de chirurgie. Ils ont subi une seconde intervention afin de réduire la hernie incisionnelle qui s'était développée. Le cinquième veau, qui avait souffert d'une persistance du canal de l'ouraque, a développé une pyélonéphrite ascendante. Il a subi une néphrectomie unilatérale et demeure à ce jour en santé. Enfin, deux veaux sont morts soudainement avant l'âge de 3 mois suite à la rupture d'un abcès dans l'abdomen. L'un souffrait d'omphalophlébite et est mort avant d'avoir pu être opéré et l'autre avait souffert d'une omphaloartérite traitée chirurgicalement qui a récidivé.

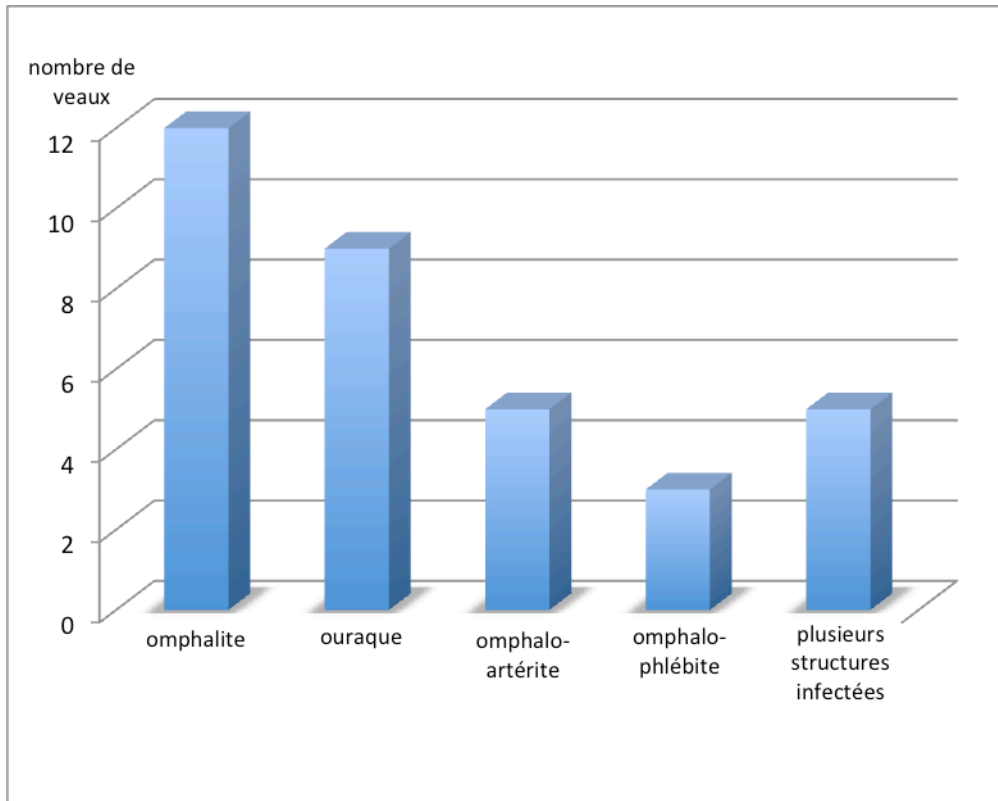


Figure 7 : Incidence des complications ombilicales chez les veaux clonés entre la naissance et l'âge de 3 mois.

Tableau X : Résultats des cultures bactériologiques des structures ombilicales infectées

veau	structure(s) infectée(s)	bactérie(s) isolée(s)
11	canal de l'ouraque et rein	<i>E. coli</i> , <i>Arcanobacterium pyogenes</i>
13	veine ombilicale	aucune croissance
16	canal de l'ouraque	aucune croissance
17	artère ombilicale et canal de l'ouraque	<i>E. coli</i> , <i>A. pyogenes</i> , anaérobies
18	artères ombilicales	<i>E. coli</i>
	canal de l'ouraque	<i>A. pyogenes</i>
19	canal de l'ouraque	<i>Proteus</i> , anaérobies
23	artères ombilicales	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	canal de l'ouraque	coques gram + et anaérobies
25	canal de l'ouraque	<i>E. coli</i> + anaérobies
	artères ombilicales	<i>E. coli</i>
26	artères ombilicales	<i>E. coli</i> , <i>A. pyogenes</i> , anaérobies

2. Formule hématologique et évaluation du transfert de l'immunité colostrale

Hématologie

Le sang destinée à la formule hématologique a été pris 5 min après la section du cordon ombilical et avant que les veaux ne reçoivent aucun traitement. À l'hématologie, les le comptage érythrocytaire ($p < 0,0001$), l'hématocrite ($p < 0,0001$), le taux d'hémoglobine ($p < 0,0001$) et le comptage lymphocytaire ($p < 0,005$) étaient inférieurs aux valeurs de référence¹²⁵.

Évaluation du transfert de l'immunité colostrale

La mesure des solides totaux et des globulines sériques a été faite à la naissance et à 48h d'âge afin d'évaluer le transfert d'immunité colostrale. La valeur moyenne des solides totaux des veaux clonés a augmenté de 50,6 à la naissance à 61,6g/L (écart type=5,1g/L) à 48h d'âge. Une valeur de solides totaux supérieure à 52g/L est compatible avec un transfert efficace¹⁶⁸. Tous les veaux clonés avec une valeur supérieure à 52g/L. La valeur moyenne des globulines sériques des veaux clonés est passée de 18,1 (écart type=2,7g/L) à 31.9g/L (écart type=7,9g/L). Un veau qui n'a pas reçu de colostrum a reçu une transfusion de plasma.

Il n'a pas été inclus dans les analyses statistiques précédentes. Ses solides totaux et ses globulines sériques étaient respectivement passés de 43,1g/L et 17,7g/L à 55g/L et 21.6g/L.

Tableau XI : Paramètres leucocytaires des 27 veaux clonés à la naissance

Paramètres	Veaux clonés	Valeurs de références ¹²⁵ n=30
Erythrocytes (*10 ¹² /L)	5,9 +/- 1,1 * p<0,0001	9,35 +/- 1,02
Hémoglobine (g/L)	74,2 +/- 19,3 * p<0,0001	128,6 +/-18,5
Hématocrite (%)	26,3 +/- 6,0 * p<0,0001	41 +/- 6
Leucocytes (*10 ⁹ /L)	12,2 +/- 4,4 p<0,1	13,99 +/- 5,73
Neutrophiles (*10 ⁹ /L)	9,4 +/- 3,8	10,94 +/- 5,7
Lymphocytes (*10 ⁹ /L)	1,3 +/- 0,5 * p<0,005	2,98 +/- 2,73
Fibrinogène (g/L)	2,3 +/- 1,3	2,58 +/- 1,38

* indique une différence significative entre les veaux clonés et les valeurs de référence

