SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES 5

LISTE DES TABLEAUX 5

LISTE DES ABREVIATIONS 6

INTRODUCTION 7

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 9

1.1. Epidémiologie du parvovirus canin CPV-2 9

1.1.1. Réplication 9

1.1.2. Survie dans le milieu extérieur et sensibilité 10

1.1.3. Excrétion du parvovirus canin CPV-2 et sources de contamination 12

1.2. Immunité, gestation, lactation 13

1.2.1. Modifications de l'immunité pendant la gestation et la lactation 13

1.2.2. Stockage des immunoglobulines dans la mamelle et formation du colostrum 15

1.2.3. Transfert de l'immunité aux chiots 17

1.2.3.1 Transfert de l'immunité maternelle anti CPV-2 17

1.2.3.2 Décroissance de l'immunité 18

1.2.3.3 Interférence vaccinale 18

1.2.3.4 Rôle protecteur de la vaccination 20

2. ETUDE EXPÉRIMENTALE 21

2.1. Animaux, matériel et methodes 21

2.1.1. Les chiennes 21

2.1.1.1. Population étudiée 21

2.1.1.2. Protocole vaccinal utilisé 21

2.1.1.3. Circulation des chiennes au sein de l'élevage 22

2.1.2. Les chiots 23

2.1.3. Prélèvements 24

2.1.3.1. Chiennes 24

2.1.3.2. Chiots 25

2.1.4. Protocole de mise en évidence du parvovirus canin CPV2 25

2.1.5 Statistiques 27
2.2. Résultats 28
2.2.1. Populations finalement incluses dans l'étude 28
2.2.1.1. Etude de l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 pendant la gestation 28
2.2.1.2. Etude de l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 pendant la lactation 29
2.2.2. Excrétion du parvovirus canin CPV2 pendant la gestation 30
2.2.2.1. Description des résultats et cinétique de l'excrétion 30
2.2.2.2. Influence de la gestation 30
2.2.2.3. Influence du stade de gestation 31
2.2.2.4. Influence du format racial 31
2.2.2.5. Influence de l'âge des chiennes 33
2.2.3.6 Influence de la taille de la portée 34
2.2.3. Evolution de l'excrétion du parvovirus canin CPV2 pendant la lactation 34
2.2.3.1. Description des résultats et cinétique d'excrétion 34
2.2.3.2. Influence du stade de lactation 35
2.2.3.3. Influence du format racial 36
2.2.3.4. Influence de l'âge des chiennes 37
2.2.3.5. Influence de la taille de la portée 37
2.2.4. Association entre l'excrétion des chiots et celle de la mère 38
2.2.4.1. Etude du premier excréteur 39
2.2.4.2. Relation entre la proportion de chiots excréteurs et évolution de la proportion de mères excrétant le CPV-2 40
2.2.4.3. Influence de la séparation des chiots et des mères sur l'excrétion de CPV-2 41

3. DISCUSSION 43

3.1. Limites de l'étude 43
3.1.1. Population étudiée et collecte d'informations 43
3.1.2. Races et effectifs représentés 44
3.2. Analyse des résultats 46
3.2.1. Comparaison aux données de la littérature 46
3.2.2. Conséquences pratiques 48
3.2.3. Perspectives 49
CONCLUSION 51
BIBLIOGRAPHIE 53

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Interférence entre les anticorps d'origine maternelle et les anticorps du jeune au cours du temps (Boullier, 2010) 19
Figure 2 : Evolution de la proportion de chiennes excrétrices en fonction du stade de gestation 31
Figure 3 : Proportion de prélèvements positifs pour CPV-2 au cours de la gestation selon le format racial 32
Figure 4 : Influence du format racial sur l'excrétion de CPV-2 au cours de la gestation 32
Figure 5 : Proportion de prélèvements positifs pour CPV-2 au cours de la gestation en fonction de l'âge des chiennes 33
Figure 6 : Proportion de chiennes excrétant le CPV-2 à la 4ème semaine de gestation en fonction de leur âge 34
Figure 7 : Proportion de chiennes excrétant le CPV-2 en fonction du stade de lactation et parmi ces chiennes, proportion de chiennes dont l'excrétion est supérieure au seuil de quantification 35
Figure 8 : Evolution des charges virales moyennes excrétées par les chiennes pendant la lactation .. 36
Figure 9 : Proportion de prélèvements positifs au CPV-2 au cours de la lactation selon le format des chiennes 36
Figure 10 : Proportion de chiennes excrétant le CPV-2 pendant la lactation en fonction de leur âge 37
Figure 11 : Périodes d'étude de corrélation entre les quantités de CPV-2 excrétées par une chienne et ses chiots 38
Figure 12 : Relation entre les charges virales excrétées par les mères (J14) et leurs chiots (J17)..... 38
Figure 13 : Relation entre les charges virales excrétées par les mères (J14) et leurs chiots (J17) uniquement pour les valeurs inférieures à 1200 copies/µL..... 39
Figure 14 : Proportion des différents types d'excrétion chez les chiots 40
Figure 15 : Evolution de la proportion de chiots atteints par le CPV-2 par portée et de chiennes excrétant le CPV-2 au cours de la lactation..... 41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentrations des immunoglobulines dans le serum, le colostrum, le lait et le liquide intestinal chez le porc, en mg/mL 16
Tableau 2 : Protocole de la PCR en temps réel 26
Tableau 3 : Population de chiennes gravides étudiées 28
Tableau 4 : Population de chiennes et de chiots étudiée pendant la lactation 29

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN Acide désoxyribo-nucléique

CPV Canine Parvovirus

DCIT Dose infectieuse sur culture de tissu

Ig Immunoglobuline

PCR Polymerase Chain Reaction

WHWT West Highland White Terrier

INTRODUCTION

Parmi les nombreux vices rédhibitoires de l'espèce canine, on recense la parvovirose, maladie virale souvent mortelle (article R213-2 du Code Rural). Elle entraine une gastroentérite hémorragique souvent associée à une déshydratation, une myocardite et une leucopénie. Cette maladie est due au parvovirus canin de type 2 (Canine Parvovirus 2), virus connu depuis une épidémie de gastroentérites hémorragiques ayant touché simultanément de nombreux chiots en Europe et en Amérique du Nord en 1978 (Parrish et Carmichael, 1986).

La parvovirose est caractérisée en moyenne par une létalité de 50% si les animaux sont traités et de 90% sans traitement, ces taux pouvant varier selon la souche infectante (Decaro et al, 2005). Il n'existe pas de traitement spécifique de cette maladie et le seul traitement est un traitement symptomatique, visant à limiter la déshydratation de l'animal. Plus l'animal est jeune, plus il est sensible au parvovirus canin du fait d'une protection vaccinale encore peu efficace et à un taux d'anticorps d'origine maternelle trop faible pour le protéger (Pollock et Carmichael, 1982). Ainsi, ce sont souvent des animaux de 6-8 semaines qui sont touchés. Le taux de mortalité peut atteindre 90% si les chiots ne sont pas traités de façon intensive (Nandi et Kumar, 2010). La mortalité, le coût du traitement en médicaments et en temps de travail, les retards de croissance et de vente des chiots sont à l'origine de pertes économiques en élevage canin. Il faut aussi ajouter les coûts additionnels liés à la mise en place de protocoles de vaccination complexes et aux précautions sanitaires à mettre en place, et globalement au temps de travail dédié au nursing des chiots, aux vaccinations supplémentaires et au nettoyage.

Si la résistance du parvovirus canin CPV-2 dans le milieu extérieur et les mesures de désinfection visant à limiter sa survie sont bien connues, on ne connait pas le rôle épidémiologique de la chienne dans la persistance du virus en élevage ni dans l'infection chez les chiots et dans l'apparition de la maladie.

Notre étude portera donc sur l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 en élevage par les chiennes pendant la gestation et pendant la lactation jusqu'au sevrage des chiots. Différents facteurs de variation sont évalués, tels que l'âge de la mère, la taille de la portée ou l'interaction avec les chiots pendant la période de lactation.

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les diarrhées du chiot peuvent être d'origine parasitaire, ou bactérienne, mais sont le plus souvent d'origine virale (coronavirus, parvovirus). La cause virale la plus fréquente de diarrhée chez un chiot est le parvovirus de type 2 (CPV-2).

1.1. Epidémiologie du parvovirus canin CPV2

Les parvovirus sont des virus non enveloppés, à symétrie icosaédrique, à ADN monocaténaire de petite taille. Le groupe des parvovirus regroupe de nombreux virus comme le virus de la panleucopénie féline, le virus entéritique du vison, qui peut aussi toucher les furets, le parvovirus du raton laveur et le parvovirus canin de type 1 et de type 2 (CPV-2). Tous ces virus sont très proches génétiquement et partagent plus de 98% du même génome.

1.1.1. Réplication

Le parvovirus canin de type 2 est un virus nu à ADN simple brin. Son ADN code pour 2 protéines : VP1 et VP2.

Des analyses de restriction et des séquençages d'ADN ont permis de distinguer 3 types de CPV-2 : CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c (Buonavoglia et al, 2001). Les différents types de parvovirus ont une répartition géographique différente. Actuellement, le type CPV-2c serait le type le plus rencontré en Amérique du Nord, représentant 48% des souches rencontrées, légèrement plus présent que le CPV-2c représentant 46% des souches rencontrées dans l'étude (Kapil et al, 2007), alors qu'une étude en 2011 sur tout le territoire du Royaume-Uni n'a pas mis en évidence de CPV-2c (Clegg et al, 2011).

Le CPV-2 ne se réplique que dans les noyaux des cellules en division et durant la phase S du cycle cellulaire. Le CPV-2 se réplique préférentiellement dans les épithélia muqueux pluristratifiés, et surtout dans l'épithélium digestif.

Les phases du cycle de réplication sont les suivantes:

- Attachement à un récepteur de surface grâce à une protéine de surface (VP1 et VP2)
- Pénétration : par endocytose (le CPV-2 est un virus nu)
- Phase d'éclipse : l'ADN est dirigé vers le noyau de la cellule, le virus utilise l'ADN polymérase de la cellule infectée, enzyme présente uniquement pendant la mitose,our fabriquer l'ADN double brin temporaire et pour produire les différentes molécules essentielles à la formation de nouvelles particules virales efficaces.
- Transcription (virus à ADN)
- Traduction : synthèse de protéines virales
- Production de nouveaux virions : synthèse de protéines utiles à la réplication puis synthèse des protéines structurales par expression du génome viral et réplication directe, puis retour à l'état simple brin.
- Excrétion des virions par lyse de la cellule hôte. En effet, l'infection par CPV-2 entraine donc une inhibition de la transcription et de la traduction de l'ADN de la cellule hôte. Les ARNm de la cellule hôte n'étant donc pas produits, le virus est en concurrence avec la cellule hôte. Finalement, l'excrétion des nouveaux virus induit la lyse de la cellule hôte. Ceci explique la forte virulence du CPV-2.

1.1.2. Survie dans le milieu extérieur et sensibilité

Le parvovirus canin est un virus nu, donc particulièrement résistant. Il peut survivre près d'un an dans le milieu extérieur à température ambiante. Il est résistant au froid et à la congélation, et présente une très grande stabilité à la chaleur. Ainsi il résiste pendant une heure à 56°C, trente minutes à 63°C et quinze minutes à 80°C et plusieurs mois à -20°C.

Le parvovirus canin est stable pour des pH compris entre 3 et 9 et résiste aussi à des pH inférieurs à 3, ce qui implique une résistance au pH gastrique.

Rapport-Gratuit.com

Il est résistant aux traitements hygiéniques considérés pourtant comme agressifs, comme l'utilisation de solvants à 60°C pendant soixante minutes et il est insensible à l'action des solvants organiques et des ammoniums quaternaires.

En revanche, le parvovirus canin est sensible à une température de 100°C si elle est maintenue plus d'une minute, au formol dilué à 1/100, à la soude, au glutaraldéhyde et à l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) s'il est au maximum diluée au trentième (Monnet 2001 d'après Cordon et Angrick, 1986 ; Moraillon, 1982 et 1994 ; Lacheretz et Jurin, 1997).

Cette résistance extrême renforce l'intérêt une mise en quarantaine des nouveaux arrivants, une surveillance étroite des animaux et des traitements hygiéniques particuliers en élevage canin afin de conserver une charge virale la plus faible possible dans l'élevage. Dans l'idéal, les éleveurs devraient séparer les locaux en un « secteur sain » et un « secteur souillé » i.e pour les animaux contaminés par le CPV-2 et devraient appliquer un principe de « marche en avant », c'est-à-dire de toujours s'occuper des animaux les plus jeunes en premier, puis de continuer les manipulations en prenant toujours des animaux de plus en plus âgés.

Les locaux doivent quotidiennement être débarrassés des souillures (fèces, vomissures) puis nettoyés avec un détergent ou de la vapeur d'eau chaude sous haute pression (70 à 90 bars) avant d'être désinfectés. Le désinfectant utilisé doit être un désinfectant efficace sur les virus nus. On peut soit utiliser de l'hypochlorite de sodium dilué à 6% préparé quotidiennement dans de l'eau froide et stocké à l'abri de la lumière, soit un agent tel que le peroxymonosulfate de potassium. Un temps de contact d'au moins 10 minutes doit être respecté avant de rincer les locaux (Crawford, 2000).

Du fait de la grande résistance du virus dans le milieu extérieur, la contamination par le CPV-2 est souvent indirecte, via les objets souillés en contact avec les animaux (gamelles…) ou sur le sol. La contamination se fait surtout par voie oro-fécale (Ikayeda et al, 2002). Les humains et certains rongeurs, en contact avec les animaux, peuvent porter le virus et jouer le rôle de vecteurs. Les manipulations et la circulation des chiots en élevage doivent donc être réfléchies.

1.1.3. Excrétion du parvovirus canin CPV2 et sources de contamination

Les principaux excréteurs (qui représentent donc la principale source de contamination des autres animaux et de l'environnement) sont les animaux malades qui excrètent le parvovirus canin dans leurs fèces et contaminent aussi leur fourrure par le biais du léchage. Des particules virales peuvent aussi être retrouvées dans les urines ou dans la salive mais les quantités sont anecdotiques comparées à celles retrouvées dans les fèces.

Le parvovirus canin est caractérisé par une incubation très courte, de 3 à 5 jours, et une excrétion longue, jusqu'à 25 jours post-infection chez certains chiots pour les souches 2b et 2c. Le CPV-2 se multiplie dans les cellules à fort index mitotique, et les cellules des villosités intestinales des jeunes animaux se divisent beaucoup. Les animaux les plus infectés sont ceux âgés de 6 semaines à 6 mois mais tous les animaux non vaccinés peuvent être infectés par le CPV-2. Une étude menée entre 1982 et 1991 montre qu'un chien non vacciné a 12,7 fois plus de chances d'être infecté par le CPV-2 (Houston et al, 1996). Et, selon un rapport nord-américain, 1,25% des chiots de moins d'un an sont infectés par le parvovirus canin de type 2 et un chien entier de moins d'un an a 23 fois plus de chances d'être malade de la parvovirose qu'un chien castré du même âge (Banfield pet Hospital, 2014).

L'excrétion virale chez les animaux peut suivre différents profils. Certains animaux n'excrèteront jamais de virus, certains en excrèteront de façon constante et d'autres de façon intermittente. La courbe d'excrétion des excréteurs intermittents est souvent plus pulsatile que celle des excréteurs constants, avec des pics d'excrétion plus fréquents, mais moindres. Les pics d'excrétion virale des excréteurs constants sont généralement d'une charge virale bien plus importante que celle des excréteurs intermittents (Kutzler, 2011). Des animaux asymptomatiques peuvent excréter une quantité non négligeable de virus.

Les animaux récemment infectés encore asymptomatiques sont d'importantes sources de contamination car un animal infecté excrète de 10^8 à 10^{11} particules virales par jour dès 3 jours après infection. L'excrétion est maximale 6 jours après infection et atteint de 10^6 à 10^9 $DCIT_{50}$ par gramme de fèces (DCIT= Dose Infectieuse sur Culture de Tissu, ceci correspond à la dose minimale de virus qui, injectée dans une culture de tissu peut détruire 50% des

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

cellules). Ces animaux infectés asymptomatiques excrètent moins qu'un animal infecté symptomatique mais la dose de virus excrétée dans les fèces est de 10^3 et 10^5 $DCIT_{50}$ par gramme de fèces. Cette dose est largement suffisante pour infecter d'autres animaux (Meunier, 1985) puisque la dose minimale infectante étant estimée à 100 $DCIT_{50}$ de CPV-2 (Monnier 2001, d'après Pollock et Coyne, 1993 ; Moraillon, 1994).

Outre les chiens, les chats peuvent également représenter des réservoirs viraux. Le parvovirus canin et le virus de la panleucopénie féline sont deux virus extrêmement proches, capables d'infection interspécifique. Une étude menée dans des refuges hébergeant des chiens et des chats a montré que le CPV-2 a acquis la capacité d'infecter les chats. Ceux-ci sont cliniquement sains et excrètent le parvovirus canin en grande quantité dans leurs fèces, les rendant ainsi réservoirs du virus pour l'espèce canine. Il semblerait aussi que le parvovirus canin puisse induire des signes cliniques chez les chats (Clegg et al, 2011).

Les animaux asymptomatiques pouvant excréter, les situations d'immunosuppression ou de challenge métabolique comme la gestation et la lactation sont potentiellement à risque.

1.2. Immunité, gestation, lactation

1.2.1. Modifications de l'immunité pendant la gestation et la lactation

Composé de 50% de gènes paternels, d'un point de vue immunitaire le fœtus appartient au non-soi et doit donc être mis à l'abri du système immunitaire de la chienne.

Les processus de mise à l'abri du fœtus sont les suivants :

- Mise en place du trophoblaste : Le trophoblaste est la partie du placenta d'origine fœtale. Ses cellules n'expriment pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1, cible des lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ (LTc $CD8^+$), il n'est donc pas reconnu comme non-soi. De plus, il est imperméable aux cellules mais perméable aux petites molécules autorisant les échanges entre la mère et le fœtus. Ainsi, le trophoblaste constitue une barrière mécanique (Boullier, 2010).

- Sécrétion de facteurs immunosuppressifs locaux : produits au niveau du placenta maternel et du trophoblaste par des cellules immuno-suppressives. Ces facteurs sont principalement les Transforming Growth Factors β2 et les prostaglandines. Les concentrations locales sont suffisantes pour neutraliser l'action des cellules Natural Killers, il est donc quasiment impossible d'engendrer localement une réaction inflammatoire (Chaouat, 2001).
- « Th1-Th2 shift of pregnancy » : modification du système immunitaire de la femelle gravide avec une diminution de l'efficacité de la réponse de type Th1 (réponse cytotoxique) et induction d'une réponse immunitaire de type Th2 (réponse humorale), ceci supprimant la réponse anti-fœtale par les cellules à médiation immune. Cette augmentation de la réponse humorale permet à la mère de produire plus d'anticorps et favorise le transfert d'anticorps de la mère au fœtus.

Lors de la gestation, la réponse humorale est exacerbée, sauf autour de la mise-bas, probablement du fait de la décharge d'hormones immunosuppressives comme la progestérone P4 (Chaouat, 2001). Ceci associé au shift Th1-Th2 et à une sensibilité aux pathogènes entrainant une réponse de type Th1 augmentée entraine un état d'immunodéficience de la chienne. Cet état d'immunodéficience est temporaire et dure environ jusqu'à 4 semaines après la mise-bas (Kutzler, 2011).

Les neutrophiles constituent une seconde population de cellules affectée pendant la gestation et le post-partum. Leurs fonctions sont altérées et ils sont moins efficaces. Ceci est dû à une élévation de la production de glucocorticoïdes. Du fait d'une réponse neutrophilique diminuée, la mère est donc beaucoup plus vulnérable aux infections bactériennes. Les lymphocytes T cytotoxiques sont le principal moyen de défense contre les pathogènes intracellulaires (virus ou protozoaires). Or les populations de cellules T sont affectées par la progestérone produite pendant la gestation, et les prostaglandines F2α, hormones produites en quantités plus importantes en fin de gestation et. Cet état immunodéficient transitoire permet la survie du fœtus mais la femelle gravide aura donc plus de mal pour se défendre contre ces pathogènes intracellulaires. Cet état immunitaire altéré permet souvent une diffusion de pathogènes gastro-intestinaux dans l'organisme

pendant la gestation (coronavirus, rotavirus, bactéries comme *Escherichia coli*…) (Kutzler, 2011).

La gestation est caractérisée par un catabolisme intense de nombreuses vitamines chez les ruminants et chez la femme. Les réserves de folates de la vache et de la brebis diminuent au cours de la gestation. Ceci étant vraisemblablement dû à un catabolisme augmenté et à la surproduction de radicaux libres. Chez la femme, une stimulation de 30% à 100% du catabolisme des folates a été mise en évidence au second tiers de grossesse. La très forte activité cellulaire mammaire pendant la gestation et la lactation est elle-même à l'origine de la production de nombreux radicaux libres, qui peuvent avoir un effet néfaste sur l'état physiologique et immunitaire de la femelle. Pendant la grossesse, l'intensité de l'attaque de l'organisme par les radicaux est accrue. L'organisme des mères peut encore être appauvri à l'occasion de la mise-bas et pendant les premières semaines de lactation. Tous ces phénomènes radicalaires d'origine physiologique détruisent une partie des vitamines et enzymes antioxydantes de l'organisme et induisent des risques de déficience (Aurusseau et al, 2004).

Pendant la gestation, la femelle mammifère augmente son métabolisme énergétique. A la naissance, la chienne dispose de suffisamment de réserves pour subvenir aux besoins des chiots. Des réserves qui pourront être mobilisées au moment de la lactation sont ainsi disponibles. Au cours de la lactation, c'est un quart de l'énergie du métabolisme de la mère qui est mobilisé pour la seule production de lait (Gayrard, 2007). Tant que la mère allaite, elle est affaiblie et se défend moins bien contre les pathogènes rencontrés.

1.2.2. Stockage des immunoglobulines dans la mamelle et formation du colostrum

Les immunoglobulines G (IgG) de la mère transitent de la circulation sanguine vers la lumière des alvéoles du tissu mammaire par passage trans-cellulaire via des récepteurs spécifiques situés sur les cellules épithéliales mammaires (Huang et al, 1992) et par voie para-cellulaire (Klopfenstein et al, 2002) et y sont stockées. Ce stockage des IgG dans le tissu mammaire a

lieu dans les dernières semaines de gestation chez les mammifères, plus précisément dans les deux dernières semaines de gestation chez la vache (Levieux, 1984). Aucune donnée n'est actuellement disponible chez la chienne.

Le colostrum est sécrété pendant 1 à 2 jours après la naissance et est très riche en protéines. Les principales protéines du colostrum sont les immunoglobulines IgG, les IgM et les IgA. Les IgG sont les immunoglobulines principales du colostrum et peuvent représenter jusqu'à 37% des protéines colostrales (Schäfer-Somi et al, 2005). Proportionnellement le colostrum contient 10 fois plus d'IgG que d'IgA (Bourne, 1973). Ces IgG colostrales proviennent pour la majorité du serum de la mère et une petite fraction est produite localement dans la mamelle (Larson, 1980).

La composition en immunoglobulines et leurs concentrations dans le colostrum et le lait sont détaillées dans le tableau 1 (d'après Bourne, 1973).

Tableau 1: Concentrations des immunoglobulines dans le serum, le colostrum, le lait et le liquide intestinal chez le porc, en mg/mL

Biological fluids	Classes of Ig			
	IgG	IgA	IgM	IgA/IgG
Serum	24.3	2.4	2.9	0.1
Colostrum (o h)	61.8	9.7	3.2	0.16
Milk	1.4	3.0	0.9	2.1
Intestinal juice (relative levels)	0.2	2.6	Trace	13.0

(Bourne, 1973)

Il y a de grandes différences de qualité de colostrum entre des chiennes d'un même élevage et la qualité du colostrum ne dépend pas de l'âge de la mère, ni de son gabarit, ni de la taille de portée. La quantité en IgG colostrales peut différer d'une mamelle à une autre pour une même chienne et il n'y a pas de lien statistiquement significatif entre la concentration en IgG sériques et la concentration en IgG colostrales (Gonnier et Rossig, 2013).

1.2.3. Transfert de l'immunité aux chiots

Le système immunitaire du nouveau-né est compétent, mais naïf. Le jeune a lui aussi une sensibilité accrue pendant les premiers mois aux facteurs nécessitant une réponse immunitaire de type Th1. Le nouveau-né est donc incapable de se défendre seul contre les agents pathogènes les premiers mois de sa vie, d'où la nécessité d'une protection passive par la mère.

1.2.3.1 Transfert de l'immunité maternelle anti CPV-2

Seuls 15% des anticorps du chiot sont d'origine placentaire. Du fait d'une placentation endothéliochoriale, le passage des immunoglobulines à travers la barrière placentaire est peu permis (Tizard, 2013).

Chez le chien le transfert de l'immunité de la mère au chiot se fait par le colostrum et par le lait.

L'immunité systémique du chiot est acquise pas un transfert passif via la consommation de colostrum dans les heures qui suivent la mise-bas. Les immunoglobulines maternelles sont absorbées par passage de la barrière intestinale. En effet, dans les 24 premières de vie du chiot, l'intestin permet encore le passage de macromolécules vers la circulation sanguine. La barrière intestinale commence à se fermer vers 4 à 8 heures de vie et est totalement imperméable aux anticorps environ 24 heures après la naissance (Chastant et al, 2013).

Environ 90% des anticorps d'origine maternelle anti CPV-2 sont absorbés via le colostrum, les autres proviennent du passage trans-placentaire (Pollock et Carmichael, 1982). Un titre en anticorps d'origine maternelle ≥ à 80 assure une protection efficace contre une infection par le CPV-2 (Decaro et al, 2005).

Le taux d'anticorps absorbés par le chiot dépend de la qualité du colostrum, de la quantité absorbée par le chiot ainsi que du délai entre la naissance et l'ingestion. Il est difficile d'estimer le taux d'anticorps d'origine maternelle des chiots, car cela dépend de la quantité et de la qualité du colostrum ingéré, de la vitesse de croissance de l'animal, et la vitesse de décroissance des anticorps d'origine maternelle est individu-dépendante. Cependant, une

étude récente a montré qu'en dessous de 2,3g/L d'IgG à 2 jours, les chiots ont un risque de mortalité accru, et que dans la population étudié, 17,6% des chiots étaient en dessous de ce seuil (Mila et al, 2014).

L'immunité des muqueuses du chiot est acquise par le lait, principalement riche en IgA. Les IgA du lait sont produites au niveau de la glande mammaire. Proportionnellement, il y a deux fois plus d'IgA dans le lait que d'IgG (Bourne, 1973). Ces IgA jouent un rôle de protecteur local au niveau de l'intestin à plus long terme.

1.2.3.2 Décroissance de l'immunité

La durée de demi-vie des anticorps d'origine maternelle anti- CPV-2 a été estimée à 9,7 jours avec une décroissance exponentielle, et ces anticorps d'origine maternelle anti-CPV2 peuvent persister jusqu'à l'âge de 13 semaines chez certains chiots. Chez des chiots de moins de 7 semaines, la présence d'anticorps anti CPV-2 d'origine maternelle en quantité telle que le titre d'inhibition d'hémagglutination ≥1:10 interfère avec une vaccination utilisant un vaccin à virus vivant atténué de panleucopénie féline, un virus inactivé de panleucopénie féline, ou un vaccin de parvovirus canin inactivé sans être par elle-même suffisante pour assurer la protection du chiot (Pollock et Carmichael, 1982).

Il faut remarquer que plus les chiots ont d'anticorps à 2 jours d'âge, plus le risque de mortalité est faible (Mila et al, 2014).

1.2.3.3 Interférence vaccinale

Les anticorps d'origine maternelle interfèrent avec la mise en place de l'immunité active du chiot. On ne peut pas avoir de réponse vaccinale efficace tant que le chiot a encore trop d'anticorps d'origine maternelle. Il faut adapter le protocole vaccinal car une vaccination trop précoce sera sans effet à cause d'une interférence entre les anticorps d'origine maternelle et les antigènes vaccinaux qui seront donc neutralisés et une vaccination trop tardive créera une période à risque pendant laquelle le jeune ne sera pas protégé. La figure 1

décrit cette période critique pendant laquelle le chiot n'a plus assez d'anticorps d'origine maternelle et a encore trop peu d'anticorps vaccinaux pour se défendre efficacement.

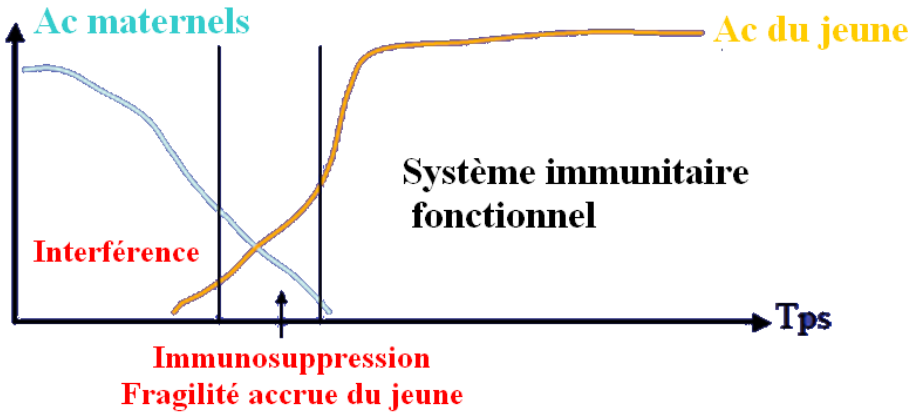

Figure 1 : Interférence entre les anticorps d'origine maternelle et les anticorps du jeune au cours du temps (Boullier, 2010)

L'utilisation d'un vaccin vivant atténué de CPV-2b administré par voie nasale induit une séroconversion de 100% chez des chiots dont le titre en anticorps d'origine maternelle anti-CPV2b est ≤ 80, et chez 51,6% des chiots dont le titre est compris entre 160 et 320. Une administration étant faite à 5 semaines et une seconde à 7semaines si les chiots n'avaient pas séroconverti (Martella et al, 2005).

Une autre possibilité de vaccination est d'utiliser des vaccins surtitrés (à partir de $10^{7,6}$ $DCIT_{50}$) sur des chiots âgés de 4 et 6 semaines, ceci permet une séroconversion significative malgré la présence d'anticorps d'origine maternelle (De Cramer et al, 2010).

Une étude a montré que 100% des chiots vaccinés à 12 semaines d'âge ont efficacement seroconverti contre le CPV-2 en n'ayant utilisé qu'une seule dose de vaccin vivant atténué sur-titré à faible passage cellulaire (donc fortement immunogène) (Hoare et al, 1997).

La vaccination des chiots est rendue très difficile du fait de la persistance des anticorps d'origine maternelle parfois jusqu'à 13 semaines d'âge, ce qui peut interférer avec la vaccination.

1.2.3.4 Rôle protecteur de la vaccination

Les vaccins actuels sont dirigés contre les variants CPV-2, CPV-2a et CPV-2b. Il n'existe pour l'instant pas de vaccin utilisant le CPV-2c mais les données actuelles de la littérature montrent que des chiots vaccinés contre le CPV-2 sont protégés contre l'infection et l'excrétion du CPV-2c (Spibey et al, 2008). Il n'est pas rare que des chiots récemment vaccinés présentent des symptômes de gastroentérite dans la semaine qui suit leur vaccination contre le CPV-2. Une étude a montré que la plupart du temps chez ces chiots, on ne retrouve pas la souche vaccinale dans leurs fèces, mais une souche sauvage et d'autres pathogènes (rotavirus, coronavirus). Il a quelques fois été retrouvé des particules virales de la souche vaccinale utilisée, mais la plupart du temps des particules virales d'une souche sauvage de CPV-2 étaient aussi retrouvées dans les fèces de ces chiots. Un animal vacciné est a priori protégé contre la maladie et n'excrète pas la souche vaccinale, mais il peut donc excréter d'autres souches (Decaro et al, 2006).

Une vaccination contre la souche CPV-2 seule ne suffit pas à assurer une protection totalement efficace contre les variants CPV-2a et 2b. Une vaccination avec un vaccin vivant atténué d'une souche CPV-2b protège efficacement des chiots contre le CPV-2, même des chiots avec un titre en anticorps d'origine maternelle anti CPV-2 élevé (60% des chiots avec un titre en anticorps de 1 :80 sont considérés comme efficacement protégés). La réaction croisée n'est efficace que dans le sens CPV-2b → CPV-2 (Pratelli et al, 1999).

La gestation et la lactation sont des périodes critiques dans la vie de la chienne reproductrice. Pendant la gestation, la chienne prépare la lactogenèse et produit des anticorps destinés à passer aux chiots via le colostrum. Pendant la lactation, le métabolisme énergétique de la chienne est détourné pour les chiots. La chienne est affaiblie et son système immunitaire n'est pas aussi compétent qu'hors période de reproduction. Nous nous sommes demandé si cette période avait une incidence sur l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 par les chiennes, même si elles sont correctement vaccinées. Nous nous sommes demandé si certains paramètres comme l'âge de la chienne, son gabarit, la taille de la portée et l'interaction avec les chiots avaient une influence sur la fréquence et la quantité de cette excrétion.

2. ETUDE EXPÉRIMENTALE

2.1. Animaux, matériel et méthodes

L'étude a été conduite dans un élevage canin du Nord de la France (département 62, Pas de Calais) hébergeant 340 chiens de race (300 femelles et 40 mâles).

2.1.1. Les chiennes

2.1.1.1. Population étudiée

- Etude de l'excrétion du CPV-2 pendant la gestation :

41 chiennes dont la saillie a eu lieu entre août 2013 et novembre 2013 ont été incluses dans cette étude prospective. Les suivis ont été réalisés du 1er août au 15 décembre 2013.

L'âge était connu pour 32 chiennes. L'âge moyen était de 4 ans, avec un écart-type de 2ans [min=1an ; max= 8ans].

- Etude de l'excrétion du CPV-2 pendant la lactation :

32 chiennes ayant mis bas entre le 1er mars et le 1er mai 2012 ont été incluses et suivies jusqu'au sevrage de leurs chiots (30 juin 2012). Les chiennes en lactation étaient logées dans un bâtiment indépendant du reste de l'élevage dit « maternité ».

L'âge était connu pour les 32 chiennes. L'âge moyen était de 5 ans, avec un écart-type de 1,7 ans [min= 2ans ; max= 8ans].

2.1.1.2. Protocole vaccinal utilisé

Toutes les chiennes de l'élevage sont vaccinées une fois par an au mois de mars avec un vaccin DHPPi+ Lepto de la marque Nobivac® (Laboratoire MSD, Beaucouzé, France). Il vaccine contre la maladie de Carré (D), l'hépatite de Rubarth (H), la Parvovirose (P), le para-influenza (Pi) et la leptospirose (Lepto).

Le vaccin contient par dose au moins 10^7 $DICT_{50}$ de parvovirus canin vivant atténué (CPV-2), souche 154. D'après le résumé des caractéristiques du produit, le vaccin est indiqué « pour une immunisation active des animaux, afin de réduire les symptômes clinique à la suite de la parvovirose ». Le vaccin ne limite aucunement l'excrétion virale du CPV-2 par les animaux vaccinés.

Le vaccin DHPPi se présente sous forme lyophylisée et, ici, le Nobivac Lepto est utilisé comme solvant.

Les nullipares et chiennes nouvellement arrivées dans l'élevage avaient été primo-vaccinées en février 2012. Ne connaissant pas le statut vaccinal des chiennes déjà présentes dans l'élevage lors de leur acquisition par les actuels éleveurs, celles-ci avaient subi une seconde session de primo-vaccination en mars 2009 avec rappel annuel en mars 2010. Au moment de l'étude chaque chienne avait donc reçu au moins deux injections de primo-vaccination à un mois d'intervalle, bien que d'après le résumé des caractéristiques du produit, une seule injection de primo-vaccination suffise sur des animaux de plus de 12 semaines. On peut considérer que les chiennes sont à jour de leur vaccination.

Les chiots sont vaccinés à l'âge de 56 jours, une fois sortis de l'étude.

2.1.1.3. Circulation des chiennes au sein de l'élevage

Les chiennes n'ont pas accès à l'extérieur si ce n'est lorsqu'elles transitent entre 2 bâtiments.

Les chiennes en gestation sont dans un bâtiment dédié dans des enclos paillés, par groupes de 2 à 5 individus selon la taille. Lorsqu'elles sont en chaleurs, elles sont déplacées dans d'autres enclos pour être mises en contact avec le mâle. Au bout de quelques jours, elles regagnent leur enclos initial et y restent jusqu'à une à deux semaines jours avant la mise-bas prévue.

Une fois par semaine, les éleveurs font entrer toutes les chiennes qui doivent mettre bas au plus tard dans les 14 jours suivants en maternité. A ce moment, elles traversent la cour de l'élevage pour rejoindre la maternité. La maternité est un bâtiment composé d'un couloir

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

central donnant sur 8 salles, 4 de chaque côté du couloir. Chaque salle est constituée de 10 cases individuelles de mise-bas, au sol bétonné chauffé recouvert de copeaux. Les chiennes restent dans ces salles de mise-bas jusqu'au sevrage des chiots (6 à 8 semaines après la mise-bas) puis repartent dans les enclos paillés. Les fèces sont enlevées tous les matins et un nettoyage quotidien à base d'eau de Javel concentrée est effectué dans toutes les pièces et couloirs de la maternité. Cette préparation d'eau de Javel est préparée quotidiennement dans de l'eau froide et est stockée dans des contenants opaques à l'abri de la lumière. Sa concentration peut légèrement varier selon la technicienne qui la prépare.

Entre le départ d'une portée de la maternité et l'entrée d'une nouvelle chienne prête à mettre bas, une procédure précise de nettoyage-désinfection de la salle est réalisée. Un premier rinçage au jet d'eau permet d'enlever tous les résidus visibles (fèces, copeaux, poils). Un dégraissage de toutes les surfaces est réalisé avec un détergent Calciclean® (Calcialiment, Crepy) en utilisant un canon à mousse. La mousse a l'avantage de rester sur les surfaces verticales ce qui permet un temps de contact d'au moins dix minutes avec toutes les surfaces. Un rinçage est effectué à l'eau chaude sous haute pression (200 bars). Ensuite, la salle est désinfectée avec un produit fongicide, bactéricide et virucide g3f® (Calcialiment, Crepy), projeté au canon à mousse pour les mêmes raisons que précédemment. Un nouveau rinçage est effectué à l'eau chaude sous haute pression et la salle est fermée à clef jusqu'à l'entrée des nouvelles chiennes. Le vide dans la salle dépend du nombre de chiennes qui doivent entrer en maternité, il peut aller de 2 jours à 14 jours.

2.1.2. Les chiots

Tous les chiots nés des 32 chiennes étudiées ont été inclus dans l'étude et prélevés de façon hebdomadaire à partir de 17 jours d'âge.

Les chiots d'une même portée restent dans la même case de mise-bas de leur naissance jusqu'à la fin de leur sevrage (âge variable mais à 56 jours le plus souvent). Ils ne sont en contact qu'avec les chiots de leur portée, leur mère et les soigneurs. Le sol est nu sur une moitié de la case et recouvert de copaux de bois sur l'autre moitié quand les chiots sont jeunes, puis entièrement recouvert de copeaux de bois lorsque les chiots sont plus grands (2

semaines pour les chiots de grandes races, plutôt 3 semaines pour les chiots de petites races).

Les cases sont nettoyées tous les matins. Pendant le nettoyage les chiots sont mis dans un bac en plastique juste devant la case. Il y a plusieurs bacs par salle de maternité mais plusieurs portées peuvent avoir séjourné dans le même bac. Les selles et les copaux souillés sont retirés, le sol est nettoyé avec de l'eau javellisée, puis rincé. Une fois le sol sec les chiots sont remis dans la case.

Une fois sevrés, ils migrent dans un autre bâtiment de l'autre côté de l'élevage. Aucun chiot échantillonné n'est vacciné. La vaccination a lieu à 56 jours, lorsque les chiots sortent de l'étude.

Chaque portée a été suivie 5 semaines à partir du 17ème jour d'âge des chiots. Au total, les prélèvements auront duré du 1er mars 2012 au 30 juin 2012.

2.1.3. Prélèvements

2.1.3.1. Chiennes

Les écouvillons rectaux ont été réalisés à l'aide d'écouvillons stériles secs, à tige en aluminium et à bout à ouate rayon. Dans l'heure qui suivait le prélèvement, les écouvillons étaient stockés au congélateur à -21°C.

Le jour de l'ovulation était déterminé par dosage de la progestéronémie. Au-delà de 7ng/mL, la chienne était considérée comme étant au jour d'ovulation. Une saillie était réalisée 24 heures après la date d'ovulation et une autre 72 heures après l'ovulation. Un écouvillon rectal était réalisé le jour de la première saillie, puis tous les 15 jours. Un diagnostic de gestation était effectué par échographie un mois après la première saillie puis confirmé toutes les deux semaines.

Afin de faciliter l'échantillonnage, tous les prélèvements d'une même semaine étaient regroupés sur une même journée. Les prélèvements étaient réalisés entre 14 et 20 jours d'intervalle.

La semaine de saillie est notée S0 (S = Semaine). Les échantillons ont donc été récoltés respectivement à S0, S2, S4, S6, S8 et en post-partum le lendemain de la mise-bas (PP).

Pendant la lactation, les écouvillons rectaux ont été réalisés chaque semaine une fois par semaine, respectivement à J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49 et J46 post-partum.

2.1.3.2. Chiots

A partir de la troisième semaine d'âge jusqu'au sevrage à 8 semaines, les fèces étaient collectées de façon hebdomadaire par écouvillonnage rectal (avec le même matériel que pour les mères) respectivement à J17, J24, J31, J38, J45 et J52.

2.1.4. Protocole de mise en évidence du parvovirus canin CPV2

Les échantillons ont été analysés au laboratoire Scanelis (Colomiers) par PCR en temps réel, utilisant la technologie TaqMan. Le test est considéré comme positif si la fluorescence mesurée est 10 fois supérieure à une intensité de référence et la quantification est possible en mesurant l'intensité de fluorescence.

- Préparation des échantillons :
    - L'embout ouaté de l'écouvillon est trempé dans une solution saline tampon pour extraire en le maximum de fèces. La suspension est brièvement centrifugée à haute vitesse (13700 g) et 200µL de surnageant sont mis à bouillir 10 minutes avant d'être réfrigérés sur de la glace. Cette étape a pour but de supprimer les inhibiteurs de la Taq polymérase qui pourraient inhiber la PCR.
    - Les échantillons sont ensuite dilués à une dilution 1:5 en utilisant de l'eau distillée, ce qui permet de rendre la concentration en inhibiteurs de la Taq polymérase, s'il en reste, à une concentration trop faible pour être efficace.

- Un contrôle interne est mis en place systématiquement pour chaque échantillon afin d'être sûr qu'il ne reste plus d'inhibiteurs de la PCR. Ce contrôle interne est réalisé en utilisant un herpès virus ovin de type 2 (approximativement 5000 copies/mL de suspension fécale).

- Amorces et sonde :
  - Les amorces sont choisies de façon à amplifier un fragment connu de 93 paires de bases appartenant à la séquence VP2 de l'ARN du parvovirus.
  - La sonde choisie possède à son extrémité 5' un groupement 6-carboxyfluorescéine (FAM) déclenchant la fluorescence et un groupement 6-carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA) permettant de stopper la fluorescence à son extrémité 3'.

- PCR en temps réel :
  - Mélange réactionnel : La PCR est réalisée avec un système de détection en temps réel. Le mélange réactionnel pour un échantillon contient 12,5µL de iQ^{TM} Supermix, 0,6µL d'amorce dans le sens 3'-5', 0,6µL d'amorce dans le sens 5'-3', 0,2µL de sonde, de la Taq Polymérase, des dNTPs et 10µL d'ADN pour aboutir à un total de 25µL par échantillon.
  - Le protocole de PCR est décrit dans le tableau 2.

Tableau 2: Protocole de la PCR en temps réel

	Etape	Température	Durée
	Préparation	95°C	10 minutes
X 40	Dénaturation	95°C	15 secondes
	Hybridation	52°C	30 secondes
	Elongation	60°C	1 minute
	Refroidissement		

2.1.5 Statistiques

La normalité des résultats a été vérifiée grâce au test de Shapiro-Wilk. Aucun des résultats quantitatifs de cette étude ne suit une distribution normale. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en conséquence.

Les analyses univariées (tests pour mesurer l'effet de la gravidité, de l'âge, du format racial, de la taille de la portée) ont fait intervenir des tests du khi², de Kruskall-Wallis et de Mann-Witney et une régression linéaire binaire. Le khi² a été réalisé sur Excel et les deux derniers tests ont été réalisés à l'aide du logiciel Tanagra® Freeware (Tanagra 1.4, Lyon).

Les analyses multivariées (lien entre stade de gestation/lactation et âge, format racial, taille de la portée) ont été réalisées de deux façons. D'abord avec des données binaires (la chienne excrète/ la chienne n'excrète pas), où le modèle a été vérifié et validé avec le test d'Homer Lemeshow avant de réaliser une régression logistique. Ensuite, les valeurs continues (mesure quantitative de l'excrétion du CPV-2 par les chiennes et les chiots) ont fait appel à un modèle linéaire mixte après vérification des résidus, et utilisation de tests non paramétriques lorsque les résidus n'étaient pas considérés comme normaux. Tous ces tests ont été réalisés avec les logiciels Tanagra® et R® (R Foundation for Statistical Computing, University of Auckland, Nouvelle Zélande).

Les prélèvements où l'excrétion est mise en évidence mais inférieure au seuil de quantification sont considérés comme positifs car les chiennes sont toutes correctement vaccinées. Pour l'analyse pendant la gestation, le niveau d'excrétion a été exprimé en log 10 de la charge virale. Lorsque l'excrétion était positive mais inférieure au seuil de quantification, nous avons choisi arbitrairement d'associer la valeur 19 copies/µL à ces prélèvements (le seuil étant fixé à 20 copies/µL).

2.2. Résultats

2.2.1. Populations finalement incluses dans l'étude

2.2.1.1. Etude de l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 pendant la gestation

Sur les 41 chiennes échantillonnées, 6 se sont révélées non gravides au moment du diagnostic de gestation. Les 6 chiennes finalement vides ont quand même été échantillonnées de la saillie à la 8ème semaine après la saillie. Une a avorté en fin de gestation juste après le prélèvement de la 8ème semaine donc a été incluse dans l'étude comme chienne gravide jusqu'à S8. Finalement, 35 chiennes ont été incluses.

Ces 35 chiennes représentent 13 races différentes. Elles ont été classées selon leur format racial : petit format pour un poids inférieur à 25kg et grand format pour un poids supérieur à 25kg (tableau 3).

Tableau 3 : Population de chiennes gravides étudiées (n=35)

Race	Effectif	Format
Bichon frisé	4	26 chiennes de petit format
Bichon maltais	2	
Caniche	1	
Cocker	7	
Lhassa apso	3	
Loulou	1	
Scottish terrier	1	
Shi-Tzu	2	
Spitz	1	
West Highland White Terrier (WHWT)	3	
Yorkshire terrier	1	
Golden retriever	5	9 chiennes de grand format
Labrador retriever	4	
Total	35 chiennes	

Le nombre de foetus par chienne a été approximé par le nombre de chiots nés total. Les chiennes ont eu de 1 à 10 chiots, avec une médiane de 5 chiots, une moyenne de 5 et un écart-type de 2.

2.2.1.2. Etude de l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 pendant la lactation

Il y avait au départ 134 chiots de 12 races différentes, appartenant à 32 portées différentes. 4 sont morts avant le sevrage mais leurs données ont été incluses dans l'étude tant qu'ils étaient vivants. En moyenne les portées étudiées comportent 4,2 chiots, avec un écart-type de 1,6 chiots, la plus petite portée n'a qu'un chiot et la plus grande portée étudiée en a 8.

Toutes les chiennes ne restent pas avec les chiots jusqu'au 56ème jour après la mise-bas. Un sevrage un peu plus précoce peut avoir lieu. Les statistiques effectuées par jour de prélèvement tiennent compte du nombre exact de chiennes encore en contact avec les chiots. Les effectifs de chiennes et de chiots échantillonnés pour cette partie de l'étude sont exposés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Population de chiennes et de chiots étudiée pendant la lactation

Race	Effectif	Format	Nombre de chiots	Format
Bichon frisé	2	23 chiennes de petit format	6	91 chiots de petit format
Bichon maltais	3		14	
Caniche	3		11	
Cocker spaniel	3		16	
Jack Russel	1		10	
Lhassa apso	5		18	
Loulou	1		4	
Shih tsu	3		11	
WHWT	2		8	
Berger allemand	1	9 chiennes de grand format	6	43 chiots de grand format
Golden retriever	5		28	
Labrador retriever	3		9	
Total	32 chiennes		134 chiots	

2.2.2. Excrétion du parvovirus canin CPV2 pendant la gestation

2.2.2.1. Description des résultats et cinétique de l'excrétion

Parmi tous les prélèvements montrant une présence du parvovirus canin CPV-2 dans les fèces pendant la gestation, seul un présente une quantité supérieure au seuil de quantification. Les autres prélèvements montrant un résultat positif correspondent à un résultat inférieur au seuil de quantification, ce qui, d'après la méthode utilisée par le laboratoire ayant analysé les échantillons, correspond à 4 copies d'équivalent génome par PCR soit 20 copies par µL en tenant compte de la dilution à 1/5 avant la réalisation de la PCR.

Parmi toutes les chiennes gravides étudiées, 4 chiennes de moins de 25kg n'ont jamais excrété de parvovirus canin CPV-2 dans leurs fèces de même que 3 chiennes de plus de 25kg (soit 17% des chiennes de petit format et 33% des chiennes de grand format).

Dix-sept chiennes n'ont excrété qu'une seule fois du CPV-2 au cours de la gestation. Seulement 5 chiennes ont excrété deux fois consécutives et on a pu observer 7 chiennes qui ont excrété de façon pulsatile, c'est-à-dire que l'on a eu plusieurs prélèvements positifs au cours de la gestation, mais jamais deux prélèvements consécutifs positifs. Les autres chiennes ont eu des profils d'excrétion avec quelques prélèvements positifs consécutifs, quelques semaines sans excrétion puis à nouveau une excrétion positive.

2.2.2.2. Influence de la gestation

Les proportions de prélèvements positifs (entre S0 et S8) ont été comparées entre les chiennes gravides (204 prélèvements) et non gravides (29 prélèvements). Est considéré comme positif un résultat même inférieur au seuil de quantification. Chez les chiennes non gravides, 24,1% des prélèvements se sont révélés positifs contre 18,6% chez les chiennes gravides ($p>0,05$).

Rapport-Gratuit.com

2.2.2.3. Influence du stade de gestation

La figure 2 présente la proportion de chiennes excrétrices en fonction du stade de gestation. Seules les chiennes déclarées gravides et ayant mis bas ont été rétrospectivement incluses (n=35).

Aucune différence significative entre les différents stades de gestation n'a été mise en évidence (p>0,05). En moyenne, 20,6% des chiennes sont excrétrices à un stade donné.

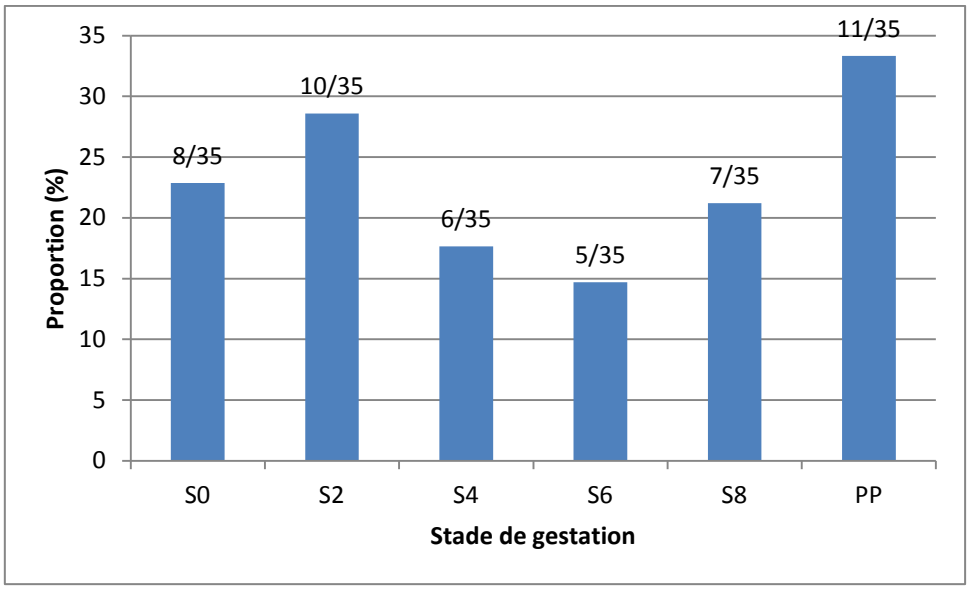

Figure 2 : Evolution de la proportion de chiennes excrétrices en fonction du stade de gestation (n = 35 chiennes, S0 = saillie et PP = Post-Partum)

2.2.2.4. Influence du format racial

Parmi l'ensemble des prélèvements des chiennes gravides, y compris ceux réalisés chez la chienne ayant avorté en S8, 26% étaient positifs chez les chiennes de petit format racial contre 13% chez les chiennes de grand format (p= 0,054, figure 3).

Les chiennes de petit format ont donc plus tendance à excréter plus souvent le CPV-2 au cours de leur gestation que les chiennes de grand format.

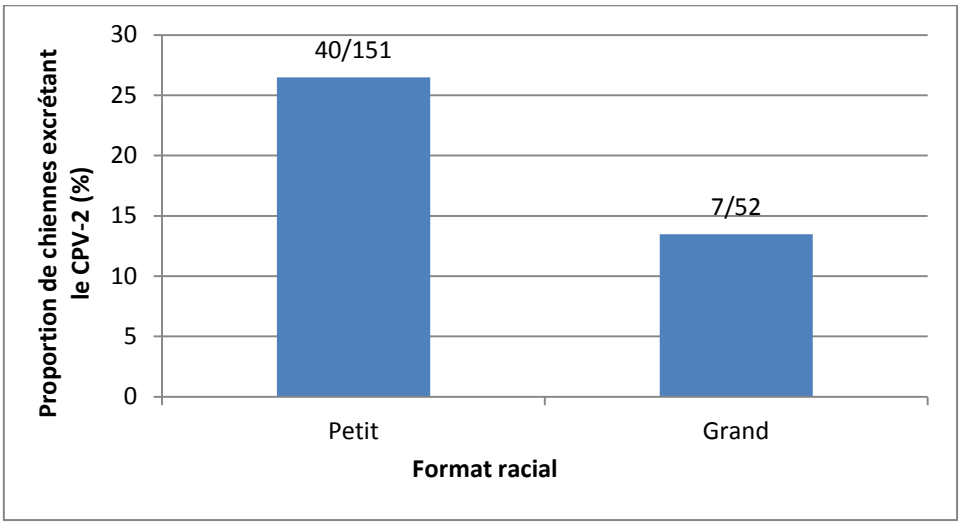

Figure 3 : Proportion de prélèvements positifs pour CPV-2 au cours de la gestation selon le format racial (chiennes de petit format n=28 chiennes et n= 151 prélèvements, chiennes de grand format n= 9 chiennes et n=52 prélèvements)

Parmi les chiennes gravides qui ont excrété au moins une fois au cours de la gestation, la répartition entre chiennes de petites races et chiennes de grandes races est la suivante (Figure 4) :

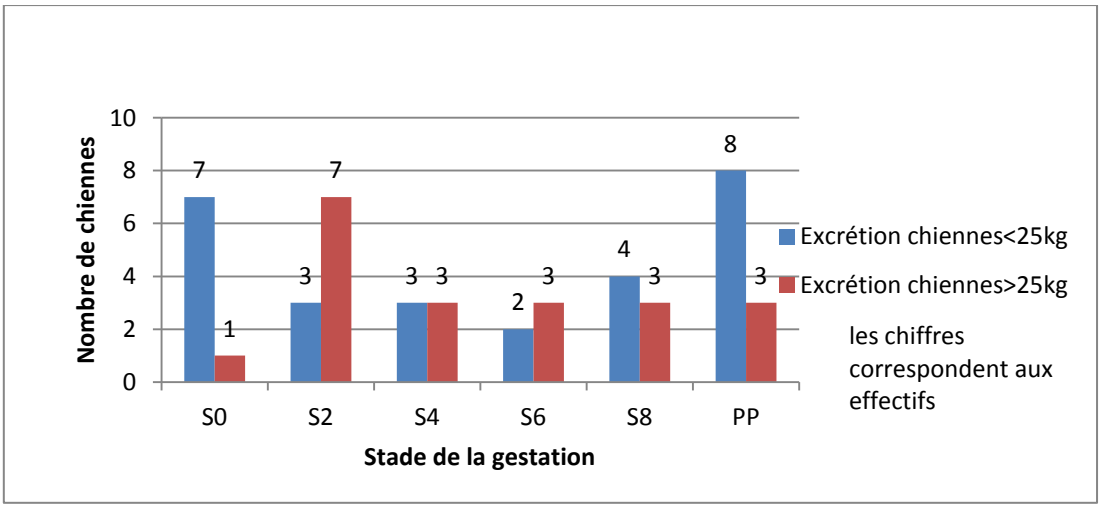

Figure 4 : Influence du format racial sur l'excrétion de CPV-2 au cours de la gestation (n total = 35 et PP= Post-Partum)

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

2.2.2.5. Influence de l'âge des chiennes

La figure 5 montre la proportion de prélèvements positifs pour CPV-2 au cours de la gestation en fonction de l'âge des chiennes.

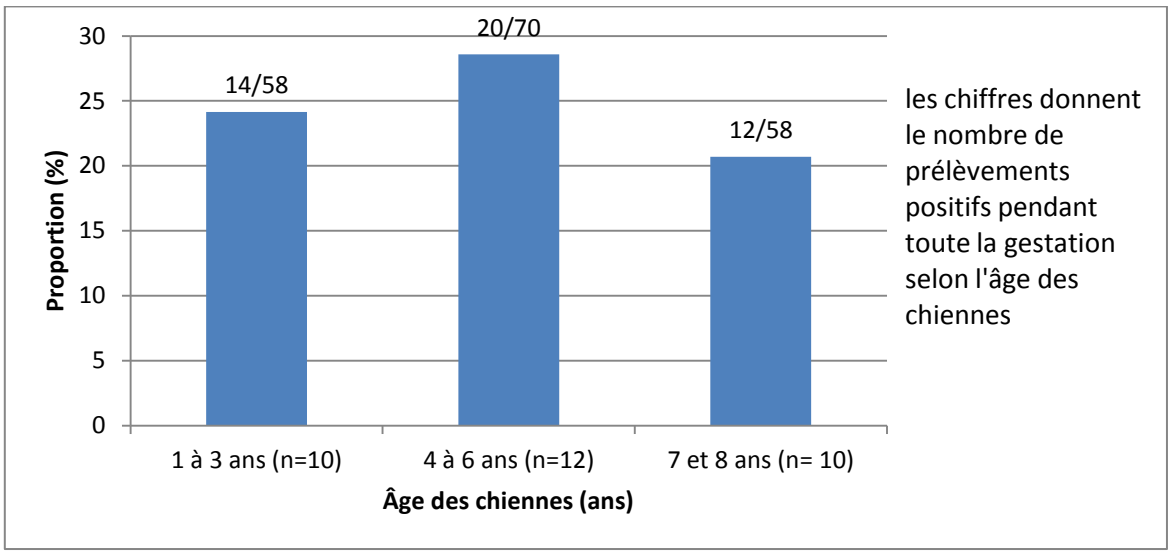

Figure 5 : Proportion de prélèvements positifs pour CPV-2 au cours de la gestation en fonction de l'âge des chiennes

Une étude statistique à l'aide du test du Khi² sur tous les prélèvements ne montre pas de différence significative entre l'âge des chiennes et l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 ($p > 0,05$).

Nous avons ensuite décidé de regarder à chaque période de prélèvement si l'âge des chiennes pouvait avoir un effet sur l'excrétion du parvovirus canin CPV-2. Pour la 4ème semaine de gestation, l'âge de la chienne a une influence sur l'excrétion du CPV-2 ($p = 0,31$, Figure 6). C'est au cours de la 4ème semaine de gestation qu'une des chiennes de 8 ans a excrété suffisamment de CPV-2 pour que la charge virale soit quantifiable. Il s'agit de la seule valeur quantifiable parmi tous les prélèvements sur toutes les chiennes suivies pendant la gestation.

Pour les autres stades de la gestation, il n'y a pas de différence significative entre l'âge des chiennes et l'excrétion de CPV-2.

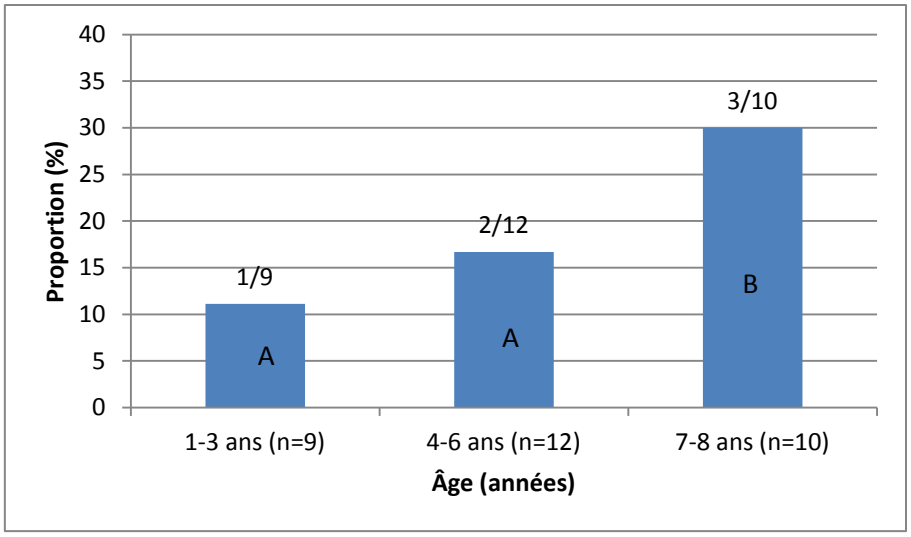

Figure 6 : Proportion de chiennes excrétant le CPV-2 à la 4ème semaine de gestation en fonction de leur âge

2.2.3.6 Influence de la taille de la portée

Pour les 32 chiennes ayant mis bas et dont le nombre de chiots à la naissance était connu, le nombre de chiots nés n'a aucune influence sur l'excrétion de CPV-2 au cours de la gestation ($p > 0,05$).

2.2.3. Evolution de l'excrétion du parvovirus canin CPV2 pendant la lactation

2.2.3.1. Description des résultats et cinétique d'excrétion

Pour 33% des prélèvements positifs, la quantité de CPV-2 excrété dans les selles a pu être quantifiée. Ainsi, nous avons à chaque fois raisonné de deux façons en étudiant les résultats de façon qualitative (la chienne excrète/ la chienne n'excrète pas de CPV-2) et de façon quantitative. Les statistiques ont donc été réalisées sur un modèle binaire, et sur un modèle linéaire.

Toutes les chiennes ont excrété le CPV-2 au moins une fois pendant la lactation, 64% d'entre elles ont dépassé au moins une fois le seuil de quantification. Six chiennes n'ont eu qu'un seul prélèvement positif pour CPV-2 et aucune chienne n'a excrété pendant toute la

lactation. Une seule chienne a eu six prélèvements positifs pour CPV-2 et il s'agit de la chienne qui a eu le plus de prélèvements positifs de toutes les chiennes échantillonnées. En moyenne, les chiennes ont eu 3 prélèvements positifs pour CPV-2 au cours de la lactation, avec un écart-type de 1,5. En moyenne, 13% des prélèvements positifs étaient supérieurs au seuil de quantification. Au total, nous avons 250 prélèvements pour 36 chiennes échantillonnées et 13% des prélèvements sont au dessus du seuil de quantification.

Tous les types d'excrétion sont possibles, à savoir une seule excrétion pendant la lactation, ou une excrétion de type pulsatile, avec un ou plusieurs pics de durée variable (de 1 à 4 semaines parfois).

2.2.3.2. Influence du stade de lactation

Le pourcentage de chiennes excrétant le CPV-2 varie significativement avec le stade de lactation et est significatif à partir de J42 comme le montre la figure 7 ($p= 1,02^{\wedge}10^{-7}$).

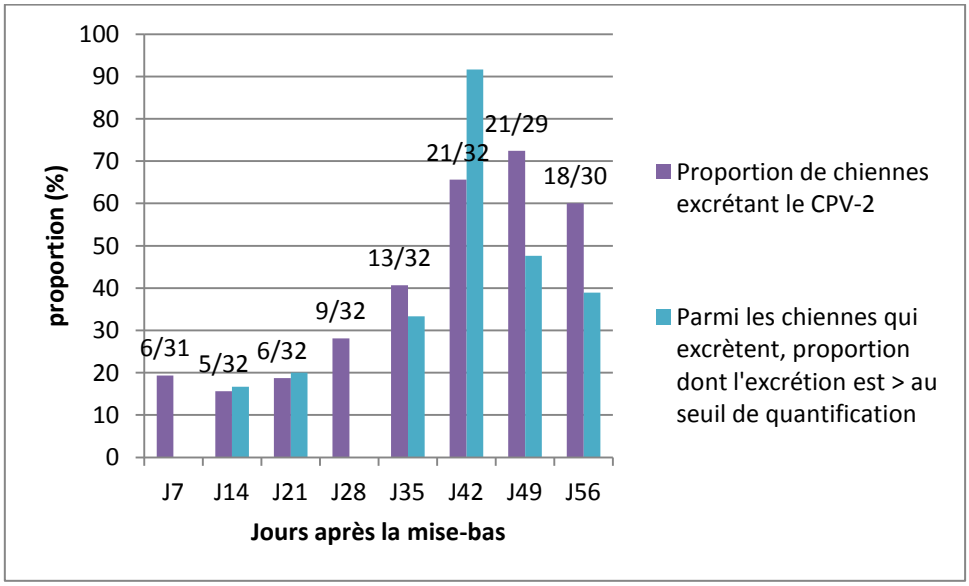

Figure 7 : Proportion de chiennes excrétant le CPV-2 en fonction du stade de lactation (n=32) et parmi ces chiennes, proportion de chiennes dont l'excrétion est supérieure au seuil de quantification. Les nombres notés sur le graphe donnent le nombre de chiennes dont le prélèvement était positif pour le CPV-2 sur le nombre de chiennes dont nous avions les prélèvements à chaque stade de lactation

La charge virale excrétée augmente également au cours de la lactation. Les chiennes tendent à excréter plus de CPV-2 à J35 qu'entre J7 et J28 ($p = 0,052$), et excrètent des charges virales

significativement supérieures à J42 (p-value = $2{,}01 \times 10^{-3}$), J49 (p-value = $4{,}31 \times 10^{-7}$) et J56 (p-value= $1{,}89 \times 10^{-6}$) qu'en début de lactation (comparaison effectuée avec J7 à J28) (figure 8).

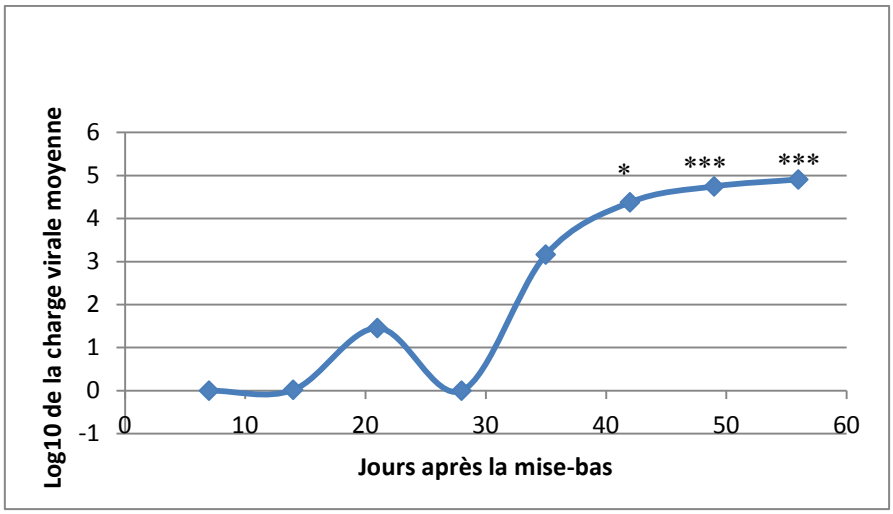

Figure 8 : Evolution des charges virales moyennes excrétées par les chiennes pendant la lactation (n=33), *=p<0,05 ** = p< 0,01 et ***=p< 0,001

2.2.3.3. Influence du format racial

Les chiennes de petit format tendent à excréter plus fréquemment que les chiennes de grand format (p= 0,06) (figure 9).

L'analyse quantitative ne met en évidence aucune différence de charge virale excrétée selon le format racial. Au cours de la lactation, la charge virale moyenne des chiennes de petit gabarit est de $6{,}28 \times 10^{3}$ particules virales par chienne et la charge virale moyenne des chiennes de grand gabarit est de $3{,}81 \times 10^{4}$ particules virales par chienne.

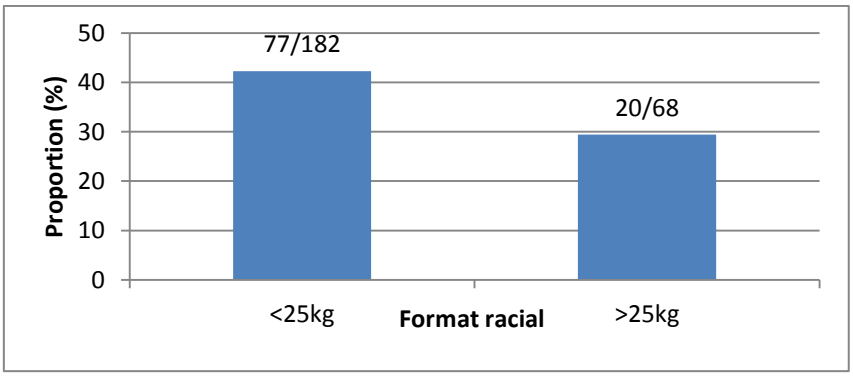

Figure 9 : Proportion de prélèvements positifs au CPV-2 au cours de la lactation selon le format des chiennes (n=250) p=0,06

2.2.3.4. Influence de l'âge des chiennes

D'après la régression binaire, l'âge des chiennes a une influence sur la fréquence de l'excrétion du CPV-2 à J14 (p=0,042) et à J49 (p= 0,034) et une tendance à J56 de lactation (p= 0,079) (figure 10), mais les variations avec l'âge ne vont pas dans le même sens pour les 3 jours où il existe une différence significative.

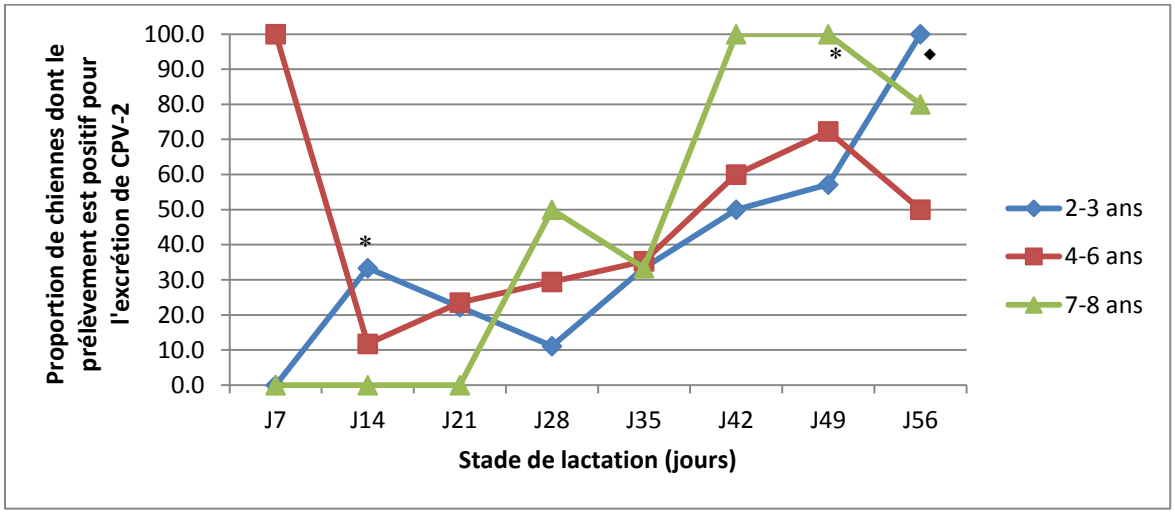

Figure 10 : Proportion de chiennes excrétant le CPV-2 pendant la lactation en fonction de leur âge (n=32 à J14, n= 23 à J49 et n=19 à J56) ∗= p-value < 0,05 et ◆= p-value [0,05 ; 0,08]

L'âge des chiennes n'a aucun effet sur la quantité de CPV-2 excrétée par les chiennes qui excrètent au cours de la lactation (p > 0,05).

2.2.3.5. Influence de la taille de la portée

D'après nos statistiques binaires, la taille de la portée n'a une influence sur le pourcentage de chiennes excrétrices qu'à 56 jours de lactation (p= 0,038) où l'on remarque que plus le nombre chiots par portée est élevé, plus la fréquence de chiennes qui excrètent est importante (et atteint 100% chez les portées de 6-8 chiots).

La taille de la portée n'a aucune influence sur la quantité de CPV-2 excrétée par les chiennes lors de la lactation (p > 0,05).

2.2.4. Association entre l'excrétion des chiots et celle de la mère

Nous avons essayé de voir si, pour chaque période de prélèvement, il y avait une corrélation entre la quantité de CPV-2 excrétée par une chienne et celle excrétée par ses chiots. La durée écoulée entre le prélèvement de la mère et des chiots n'est jamais de plus de 4 jours, donc inférieure à la durée d'incubation du parvovirus canin. Afin de voir s'il y avait un lien, nous avons donc testé à chaque fois l'association mère prélevée en premier/chiots et l'association chiots prélevés en premier/ mère. Ayant 6 prélèvements par chiot et 7 prélèvements par mère, au total eu 12 périodes à étudier, les associations de prélèvements testées sont résumées sur la figure 11.

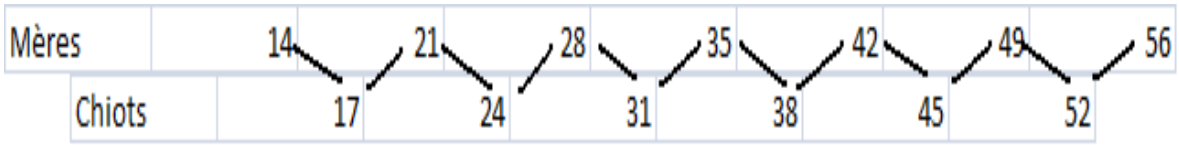

Figure 11 : Périodes d'étude de corrélation entre les quantités de CPV-2 excrétées par une chienne et ses chiots

Pour chaque période, on a effectué un « nuage de points » entre l'excrétion d'une mère et celle de chacun de ses chiots, pour toutes les portées. Le coefficient de corrélation « r » était à chaque période bien trop faible et p était > à 0,5, il n'y a significativement pas de relation entre l'excrétion quantitative de CPV-2 d'une mère et de ses chiots.

La figure 12 montre en exemple lorsque nous avons étudié l'excrétion des mères à J14 et des chiots à J17, r^2= 0,0012 et p-value = 0,69 ; la figure 13 zoome sur les faibles valeurs.

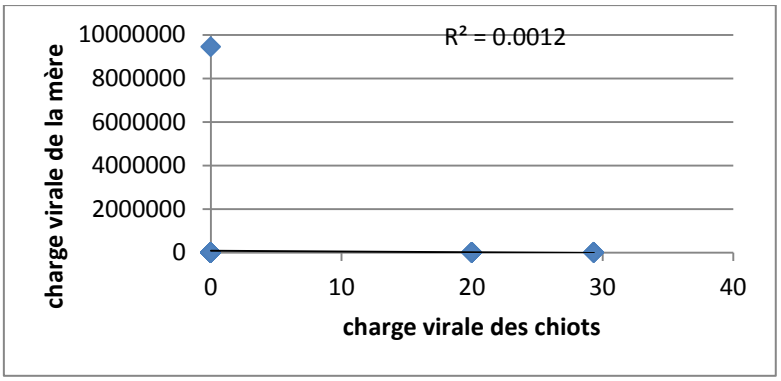

Figure 12 : Relation entre les charges virales excrétées par les mères (J14) et leurs chiots (J17) (n=32 chiennes et n= 129 chiots)

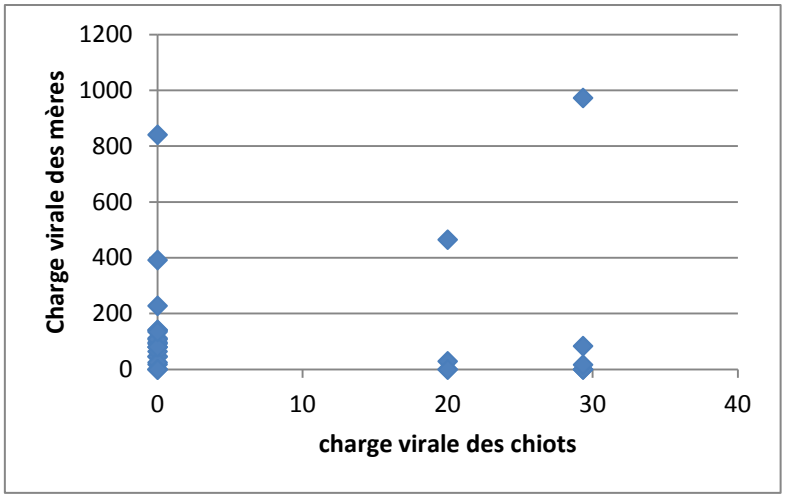

Figure 13 : Relation entre les charges virales excrétées par les mères (J14) et leurs chiots (J17) uniquement pour les valeurs inférieures à 1200 copies/µL (n=32 chiennes et n= 129 chiots)

2.2.4.1. Etude du premier excréteur

Pour chaque portée et pendant toute la durée de la lactation, nous avons regardé qui était, de la mère ou du premier chiot excréteur de la portée, le premier à excréter du CPV-2 dans ses fèces, et ce quelle que soit la durée s'écoulant entre l'excrétion du premier à excréter et du second individu dans une portée.

Trois profils étaient possibles :

- La mère n'excrétait ni avant le chiot, ni après : le chiot excrète mais cela n'a aucune influence sur la mère,
- La mère excrétait avant le chiot, et excrétait ou non après : on peut seulement dire que la mère excrétait avant le chiot,
- La mère n'excrétait pas avant le chiot mais excrétait dans les 3 jours qui suivaient le prélèvement du chiot : on ne peut savoir si c'est l'excrétion du chiot qui a contaminé la mère ou si la mère était en phase d'incubation, l'infection des deux est alors considérée comme concomitante.

Dans 48% des portées l'infection chienne/chiot est concomitante, dans 24% des portées le chiot excrète avant la mère, et dans 28% des portées la mère excrète avant le chiot.

La mère n'excrète pas plus fréquemment en premier chez les races de petite ou de grande taille (p=1), l'âge de la mère n'a pas non plus d'effet sur ce profil d'excrétion (p= 0,42). En revanche lors de petites portées (1,2 ou 3 chiots), c'est plus souvent la mère qui excrète en premier du CPV-2 dans les selles qu'un des chiots (p = 0,0102).

2.2.4.2. Relation entre la proportion de chiots excréteurs et évolution de la proportion de mères excrétant le CPV-2

Chez les chiots, on peut différencier trois types d'excréteurs : ceux qui n'excrètent pas de CPV-2, ceux qui en excrètent en faible quantité et ceux qui en excrètent en très fortes quantités (plus de à 1000 copies/µL). Au seuil de 1000 copies/µL les animaux sont considérés atteints de parvovirose.

La figure 14 décrit les variations des proportions des trois types d'excréteurs chez les chiots.

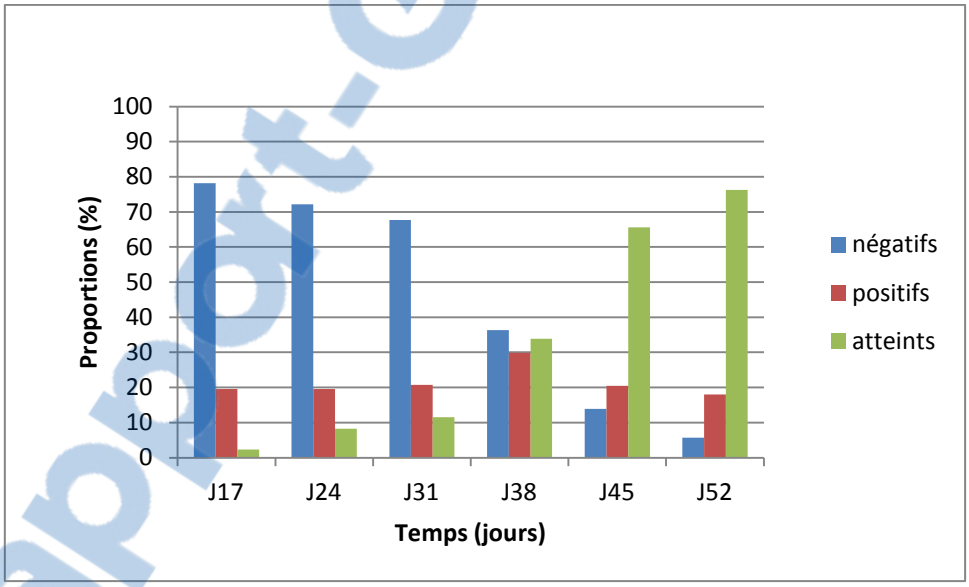

Figure 14 : Proportion des différents types d'excrétion chez les chiots, chiots négatifs, chiots positifs : chiots excrétant de façon supérieure au seuil de quantification mais < à 1000 copies/µL, chiots atteints : chiots dont l'excrétion est > 1000 copies/µL au cours de la lactation (n=134 chiots)

Plus les chiots vieillissent, plus la proportion de chiots atteints par le CPV-2 augmente. Nous nous sommes demandé s'il y avait un lien entre cette évolution et la proportion de mères excrétant le CPV-2. Nous avons donc décidé de regarder au sein de chaque portée comment

Rapport-Gratuit.com

évoluait la proportion de chiots atteints par le CPV-2 et l'avons comparée à la proportion de mères excrétant le CPV-2 (figure 15).

La proportion de chiots atteints par le CPV-2 au sein de la portée augmente tout au long de la lactation pour atteindre 70% de chiots au sein des portées au moment du sevrage. De J21 à J49, la proportion de mères qui excrètent le CPV-2 augmente.

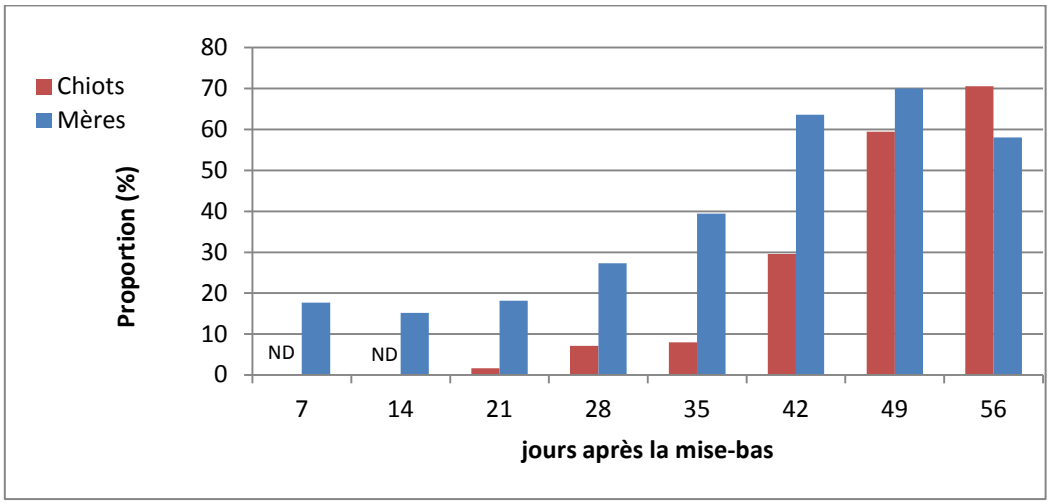

Figure 15 : Evolution de la proportion de chiots atteints par le CPV-2 par portée et de chiennes excrétant le CPV-2 au cours de la lactation (n=32 chiennes et n=134 chiots)

2.2.4.3. Influence de la séparation des chiots et des mères sur l'excrétion de CPV-2

Toutes les mères ne sont pas restées avec leurs chiots jusqu'au 56ème jour de lactation. Certaines ont pu être retirées plus tôt (portées trop nombreuses et chienne n'arrivant plus à nourrir tous les chiots correctement, chiennes dangereuses pour les chiots…). Ici, 3 chiennes ont été retirées entre le 33ème et le 35ème jour de lactation, 2 chiennes ont été retirées entre le 36ème et le 42ème jour de lactation, 6 chiennes ont été retirées entre le 43ème et le 49ème jour de lactation, 2 chiennes ont été retirées au 50ème jour de lactation et 19 chiennes sont restées avec leurs chiots jusqu'au 56ème jour de lactation.

A J56, la proportion de chiennes excrétrices est significativement supérieure chez les chiennes restées avec leur portée jusqu'à J56 (73,7%) que chez les chiennes séparées des chiots (30%) (p-value= 0,046, Test de Fischer).

Une étude statistique à l'aide du test du Khi² sur tous les chiots à J45 et à J52 ne montre pas d'influence du retrait des mères sur la proportion de chiots atteints par le CPV-2 ($p > 0,05$). La proportion de chiots atteints par le CPV-2 au sein d'une même portée n'est pas significativement différente à J45 et à J52 entre les chiots encore avec leur mère et les chiots sevrés ($p > 0,05$).

Un retrait des chiennes après J49 et avant J56 pourrait avoir une influence sur la diminution du nombre de chiennes qui excrètent le CPV-2 et donc qui le propagent dans l'élevage mais n'a pas d'influence sur l'excrétion des chiots.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3. DISCUSSION

Le principal résultat de ce travail est d'avoir observé en forte fréquence une forte excrétion fécale de CPV-2 chez des chiennes correctement vaccinées et dans des locaux régulièrement nettoyés.

3.1. Limites de l'étude

3.1.1. Population étudiée et collecte d'informations

A partir de fèces de chiens il est possible de rechercher le parvovirus canin de type 2 par ELISA ou par hémagglutination mais la sensibilité de ces techniques est relativement faible. La technique de mesure du CPV-2 par PCR en temps réel donne des résultats quantitatifs avec une excellente sensibilité et spécificité (Decaro et al, 2004). La technique que nous avons utilisée dans cette étude est actuellement la technique la plus fiable et la technique qui permet de mieux quantifier la quantité de CPV-2 excrétée.

Pendant la gestation, il nous manque une donnée importante. Etant donné que les chiennes sont plusieurs par enclos, il aurait été intéressant de savoir quelles chiennes partageaient les mêmes enclos, afin de voir si cela avait une importance sur l'excrétion du CPV-2 par les chiennes, s'il y avait une concomitance entre l'excrétion de CPV-2 par les chiennes d'un même enclos ou non, ce qui éventuellement permettrait de mettre en évidence des « zones à risque » dans l'élevage.

Il nous manque aussi une donnée qui est le rang de gestation, et donc de lactation, des chiennes. On peut supposer qu'une chienne de 2 ans est nullipare, mais ceci sans certitude, et on ne sait rien sur les chiennes plus âgées. Selon leur âge de mise à la reproduction et leur fertilité, deux chiennes du même âge peuvent ne pas avoir le même rang de portée. Il serait plus intéressant d'étudier l'effet du rang de gestation/lactation sur l'excrétion du CPV-2 par les chiennes plutôt que leur âge.

Pendant la gestation, l'échantillonnage n'était, pour des raisons pratiques, par forcément réalisé exactement tous les 15 jours. Les prélèvements étaient regroupés sur une même

journée sur toutes les chiennes devant être prélevées dans la semaine. Or, pendant la gestation, les quantités de CPV-2 excrété sont extrêmement faibles, très généralement inférieures au seuil de quantification du laboratoire et l'excrétion des chiennes est souvent pulsatile avec un prélèvement positif inférieur au seuil de quantification, puis négatif le prélèvement suivant. Un échantillonnage au jour exact de prélèvement prévu aurait-pu nous donner quelques résultats différents pour certaines chiennes. Quoi qu'il en soit, l'échantillonnage tel qu'il a été réalisé nous montre une excrétion pulsatile en faible quantité par des individus correctement vaccinés.

Les chiennes gravides excrètent peu par rapport aux chiennes en lactation. La lactation serait-elle un challenge immunitaire plus important que la gestation ? Pourquoi cette excrétion est-elle encore plus importante en milieu de lactation ? Sont-ce les chiots qui multiplient le virus à ce moment-là ? L'échantillonnage des chiots à partir de J 21 ne nous permet pas de dire s'ils excrètent du parvovirus avant. Il serait intéressant de mieux évaluer le moment où les chiots commencent à excréter le CPV-2 pour voir leur rôle dans l'excrétion de la mère.

3.1.2. Races et effectifs représentés

Dans cette étude, les chiennes de grand gabarit ne sont représentées que par des Golden retriever, des Labrador retriever et une chienne Berger allemand. Le nombre de chiennes de grand gabarit est assez faible par rapport au nombre de chiennes de petit et moyen format (18% des chiennes étudiées sont des chiennes de grand format racial). De plus, les grandes races que nous avons échantillonnées sont des races qui ont très peu été étudiées quant à leur excrétion du parvovirus canin CPV-2 bien que très représentées dans la population canine. En effet, les grandes races déjà étudiées étant principalement le Doberman et le Rottweiler (Houston et al, 1996). Etant donné que nous avons étudié des races peu étudiées dans la littérature, il serait intéressant d'évaluer la sensibilité inter-raciale des chiennes au CPV-2.

Les chiennes de moyen gabarit (15-25kg) n'étaient représentées que par la race des cockers, et elles ont donc été finalement regroupées avec les chiennes de petit gabarit. Peut-être que si nous avions pu mieux différencier les formats raciaux, les résultats auraient été différents.

On constate un biais quant aux individus choisis. En fin de lactation, on a remarqué un effet « âge » et un effet « taille de la portée » sur l'excrétion de CPV-2, mais en détaillant on observe que les 2 portées de 1 chiot sont représentées par des chiennes de 7 ans, et que 5 des 6 portées de 3 chiots sont représentées par des chiennes de 6 ans, la dernière portée de 3 chiots étant d'une chienne de 7 ans. Les portées de 3 chiots sont représentées par les chiennes appartenant à la catégorie « chiennes âgées ». Il y a donc une confusion entre l'effet de l'âge et celui de la taille de la portée. Un échantillonnage plus important avec quelques chiennes de tous âges et ayant des portées de tailles différentes est nécessaire pour affiner nos résultats.

Nous n'avons qu'une seule portée de 8 chiots. Elle constitue la plus grande portée de l'étude. Une étude rétrospective sur 10 810 portées donne une moyenne de 5,4 chiots par portée (Svedrup et al, 2011) et on peut parfois avoir de très grandes portées à la naissance. En effet, certaines races, comme le dalmatien, peuvent avoir une moyenne de presque 10 chiots par portée (Juraschko et al, 2003). Ces très grandes portées (jusqu'à 14 chiots) ne sont pas représentées dans nos données. Etant donné que nous avons montré qu'en fin de lactation les mères de portées nombreuses excrètent plus de CPV-2 que les chiennes de petites portées, il nous manque une partie de la population canine pour avoir une étude complète et confirmer nos résultats.

La question de la primocontamination des chiennes est importante : se contaminent-elles en tant que chiot? Ou au contact des adultes pourtant vaccinés ? Une mise en quarantaine des nouvelles reproductrices lors de leur arrivée dans l'élevage ainsi qu'un écouvillon rectal permettraient de savoir si les chiennes se primocontaminent dans l'élevage où si elles excrètent déjà avant.

3.2. Analyse des résultats

3.2.1. Comparaison aux données de la littérature

Toutes les chiennes de l'élevage sont correctement vaccinées et nos études ont eu lieu entre 4 et 7 mois après le rappel vaccinal pour les femelles gravides, et entre le rappel et 4 mois après pour les chiennes en lactation, dans un élevage où le rappel est annuel. Or nous avons observé une excrétion virale fréquente, à la fois chez les chiennes gravides et chez les chiennes en lactation. Chez les chiennes en lactation, les charges excrétées peuvent être élevées. Il est évident que le vaccin ne protège pas contre l'excrétion du parvovirus canin. Pour étudier l'influence de la vaccination sur l'excrétion du CPV-2 par les chiennes il faudrait une étude plus longue, si possible couvrant des chiennes en gestation juste après le rappel annuel de vaccination, et presque un an après ce rappel. Il serait intéressant d'échantillonner les mêmes chiennes pendant la lactation et la gestation, pour comparer de façon plus fiable l'excrétion du CPV-2 pendant la gestation et pendant la lactation.

Dix des prélèvements positifs de chiots de notre étude excrétant du parvovirus canin ont été typés et les 10 échantillons correspondaient à CPV-2a, soit une souche différente de la souche vaccinale avec laquelle les mères ont été vaccinées. Pour l'instant la souche excrétée par les mères n'a pas été typée mais il faudrait l'envisager. On peut aussi se demander si cette excrétion est constante ou si elle est liée aux états physiologiques de gestation et de lactation des chiennes. Pour répondre à cette question il serait intéressant d'avoir quelques échantillons avant que les chiennes ne soient gravides, pour voir si elles excrètent déjà avant la gestation, et après le sevrage et pour voir si une chienne qui excrète pendant la lactation continue à excréter après la lactation.

Le fait de retrouver dans des fèces d'animaux des particules virales de souche différente de celle utilisée chez les mères est en accord avec les résultats de Decaro et al (2006) qui montrent qu'on peut retrouver du parvovirus canin différent de la souche vaccinale dans les fèces de chiens vaccinés. Les travaux de Spibey et al (2006) montrent que des chiens vaccinés avec le même vaccin que celui qui est utilisé dans notre élevage, ne présentent pas de signes cliniques ni n'excrètent de CPV-2c lorsqu'ils y sont confrontés. Enfin, les travaux de Siedek et al (2011) montrent que des chiots Beagle de 15 semaines vaccinés contre le CPV-2

et confrontés à du CPV-2b et du CPV-2c ne présentent aucun signe clinique de parvovirose, et que les charges virales de CPV-2b et CPV-2c retrouvées dans les fèces de ces chiots sont cent fois moindres que celles retrouvées chez les chiots non vaccinés. Aucune particule virale de la souche vaccinale n'a été retrouvée dans les fèces des chiots.

Le rôle épidémiologique des adultes dans l'excrétion du CPV-2 dans cet élevage pourrait aussi être étudié en échantillonnant des chiennes hors gestation et hors lactation (ce qui constituerait un groupe contrôle) et en échantillonnant quelques mâles.

Nous n'avons étudié ici que le CPV-2. Mais dans la mesure où certaines études ont montré que la mortalité des animaux atteints semblerait moins élevée avec le CPV-2c qu'avec les autres variants (Decaro et al. 2005), il pourrait être intéressant de génotyper les CPV-2 rencontrés dans chaque élevage pour adapter au mieux le protocole vaccinal et la souche vaccinale à utiliser.

Les différents parvovirus connus sont très souvent responsables de troubles de la reproduction, avec des avortements et des momifications fœtales, comme c'est souvent le cas chez les porcins (Xie et al, 2010) et parfois même chez l'humain (Anand et al, 1987). Parmi nos chiennes, une a avorté et son premier prélèvement, le jour de la saillie, était positif mais inférieur au seuil de quantification du CPV-2. Six chiennes se sont révélées vides, et 5 ont excrété au moins une fois le parvovirus pendant les 8 semaines où elles ont été suivies. Nous ne savons pas si ces chiennes étaient réellement non gravides sur toute la période par absence de fécondation ou si cela était dû à un avortement précoce. Ceci pourrait modifier nos résultats lorsque nous avons différencié les chiennes gravides des chiennes non gravides. Bien que le parvovirus canin ne soit pas connu comme un des principaux pathogènes responsables de troubles de la reproduction et d'avortements, cela pourrait être une piste à étudier. Le parvovirus chez l'humain peut aussi être responsable de diarrhées chez le jeune adulte, mais cela est très peu référencé, car contrairement aux chiens, les parvovirus humains sont bien loin d'être la cause principale des diarrhées (Phan et al. 2012) alors qu'ils le sont chez le jeune chiot (Kapil et al. 2007).

3.2.2. Conséquences pratiques

Les procédures de nettoyage et de désinfection dans l'élevage étudié étaient drastiques et ciblées contre CPV-2 mais elles n'empêchent pas la circulation du virus. Les chaussures des travailleurs trempent chaque nuit et lors de chaque pause dans de l'eau de Javel mais cela ne semble pas suffisant. Il faudrait probablement envisager des tenues propres à chaque bâtiment, voire à chaque salle de maternité, nettoyées très régulièrement, et le port de gants plus fréquent, ainsi que l'utilisation de caisses propres à une portée et non à une salle de maternité pour éviter une dissémination du parvovirus canin dans les bâtiments et entre portées. On peut supposer que, même en désinfectant l'environnement, si ce sont les mères qui exposent les chiots, il sera difficile d'éradiquer le parvovirus dans l'élevage.

Le retrait des mères 50 jours après la naissance semble diminuer fortement la proportion de mères qui excrètent le CPV-2 après le retrait des chiots. Bien qu'il soit fortement conseillé de laisser les chiots avec leur mère jusqu'à 8 semaines d'âge pour que les chiots soient correctement socialisés, cette technique pourrait être conseillée en ciblant les chiennes plutôt âgées avec des portées nombreuses (à partir de 6 chiots) étant donné que celles-ci excrètent plus de CPV-2 que les jeunes chiennes ou les chiennes ayant 1, 2 ou 3 chiots par portée en fin de lactation. Dans la mesure où le retrait des mères n'a pas d'influence sur la proportion de chiots qui excrètent le CPV-2 au sein d'une portée, les mères ne constituent pas un risque pour les chiots, ce sont les chiots qui se multiplient le CPV-2 entre eux. La mère ne constitue pas un risque pour ses chiots, mais constitue plutôt un risque pour la dissémination du CPV-2 dans l'élevage. En retirant la mère, on ne diminue pas le risque de mortalité des chiots. On pourrait laisser la mère avec ses chiots jusqu' à la fin du sevrage. Des prélèvements sur les mères après la séparation avec les chiots permettraient de savoir si elles excrètent encore et donc comment gérer leur retour avec les autres chiennes (en envisageant un isolement des autres chiennes tant qu'elles excrètent par exemple).

Parmi les 134 chiots étudiés, seuls 4 sont morts pendant la durée de l'étude. Bien que les chiots à J 52 soient très fortement excréteurs de CPV-2, et donc potentiellement sujets à développer une parvovirose, la mortalité des chiots dans l'élevage est très faible. Il semblerait qu'une séroconversion ait eu lieu en fin de lactation, et que les chiots soient

désormais protégés contre une parvovirose due à CPV-2 et à CPV-2a. Le déclenchement de la maladie ne semble pas dû uniquement au virus.

3.2.3. Perspectives

Il conviendrait de reconduire une telle étude avec plus de chiennes par groupes, pour pouvoir dissocier l'âge de la mère de la taille de la portée, si possible de le faire dans plusieurs élevages et sur une plus longue période, afin de vraiment identifier des types de reproductrices à risque.

Maintenant que nous pouvons étudier l'excrétion du CPV-2 par les chiennes pendant la gestation et en début de lactation, il serait intéressant de regarder s'il y a une corrélation entre la durée écoulée depuis la dernière vaccination, l'excrétion de CPV-2 par les chiennes pendant la gestation et la qualité du colostrum en anticorps anti-CPV2.

Nous n'avons pas étudié l'évolution du taux d'anticorps anti-CPV-2 des mères ni pendant la lactation, ni pendant la gestation. Cependant, de nombreuses études sur le cytomegalovirus chez la femme ont montré qu'une séroconversion est possible pendant la gestation et qu'une excrétion du virus en fin de gestation sans augmentation du taux d'anticorps circulants est possible (Stern et al, 1973). Une autre étude prospective en Italie a montré une corrélation entre l'augmentation du taux d'anticorps anti-cytomegalovirus circulants et une excrétion du virus pendant la gestation (Natal et al, 1997). Enfin, une ancienne étude montrait l'éventualité d'une réactivation du système immunitaire pendant la gestation de la femme, avec un taux d'anticorps anti-cytomegalovirus circulants chez la femme enceinte supérieur à celui des femmes non enceintes (Schmitz et al, 1977). Ce phénomène de réactivation de l'excrétion virale et de l'augmentation d'anticorps chez la femme enceinte a aussi été aussi démontré avec le polyomavirus, mais dans ce cas, une augmentation du titre en anticorps pendant la gestation sans excrétion virale a pu être démontrée (Coleman et al, 1980). Chez l'animal, des chèvres gravides infectées expérimentalement par *Coxiella burnetii* ont toutes avorté, des bactéries ont été retrouvées en grande quantité au niveau du placenta, du lait et des fèces après l'avortement, et le titre en anticorps anti-coxiella circulants de toutes les chèvres a augmenté de 21 jours post-inoculation à la fin de l'étude

(Arricau Bouvery et al, 2003). Tous les cas de figure sont donc possible quant à l'évolution des anticorps pendant la gestation.

Rapport-Gratuit.com

CONCLUSION

Cette étude prospective évaluant la fréquence d'excrétion et la quantité excrétée de parvovirus canin CPV-2, par des chiennes en gestation et en lactation, dans un élevage canin français multiracial a permis de mettre en évidence le fait que des adultes pourtant correctement vaccinées excrètent du parvovirus canin pendant la gestation et la lactation, et sont donc un foyer pour leurs chiots.

En ce qui concerne l'interaction mère/chiots nous avons pu constater que plus on avance dans la lactation plus il y a de chiennes qui excrètent de CPV-2, et que lorsqu'on retire leurs chiots aux mères, celles-ci tendent à excréter moins souvent de CPV-2. Le retrait a donc un effet protecteur sur leur fréquence d'excrétion. Toutefois les chiots continuent à excréter et continuent de propager du CPV-2 dans l'élevage lorsqu'ils changent de bâtiment avant d'être vendus. De plus, chez les chiots fortement excréteurs, le risque de développer la maladie est toujours présent, même après la séparation avec les mères.

Si des femelles correctement vaccinées excrètent du CPV-2 dans leurs fèces pendant la gestation, et en quantité non négligeable pendant la lactation, existe-t-il des moyens de contrôler, voire limiter cette excrétion pendant la lactation ? Ces moyens ou méthodes seraient-ils facilement applicables en routine pour des éleveurs ?

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE

Université Paul Sabatier TOULOUSE III

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussignée, Sylvie CHASTANT, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **BROUSSOU Diane** intitulée **« Etude de l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 par la chienne pendant la gestation et la lactation»** et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 18 novembre 2014
Professeure Sylvie CHASTANT
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Bettina COUDERC

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT

Melle BROUSSOU Diane
a été admis(e) sur concours en : 2009
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2013
a validé son année d'approfondissement le : 17/07/2014
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

BIBLIOGRAPHIE

- Anand A., Gray E., Brown T., Clewley J., Cohen B., 1987, *Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis*, the New England Journal of Medicine, 316, 183-186.

- Arricau Bouvery N., Souriau A., Lechopier P., Rodalakis A., 2003, *Experimental Coxiella burnetii infection in pregnant goats : excretion routes*, Veterinary Research, BioMed Central, 34, 423-433.

- Aurousseau B., Durand D. Gruffat D., 2004, *Contrôle des phénomènes oxydatifs pendant la gestation chez les monogastriques et les ruminants*, INRA Productions Animales., 17, 339-354.

- Banfield pet Hospital, 2014, *State of pet Health™ Report*, www.stateofpethealth.com, 26-29.

- Bertagnoli S., 2010, *Les parvoviridae*, cours d'infectiologie et virologie ENVT 1ère année

- Borge K.S, Tønnessen R., Nødtvedt A., Indrebø A., 2011, *Littersize at birth in purebred dogs, a retrospective study of 224 breeds*, Theriogenology, 75, 911-919.

- Boullier S., 2010, *Immunité de la gestation et du nouveau-né*, Cours d'immunologie ENVT 2ème année

- Bourne, 1973, *The mammary gland and neonatal immunity*, Veterinary Science Communication, 1, 141-151.

- Buonavoglia C., Martella V, Pratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D., Bozzo D., Elia G., Decaro N., Carmichael L., 2001, *Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy*, Journal of General Virology, 82, 30121-3025.

- Chaouat G., 2001, *Immunologie de la gestation* in *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, C. Thibault, M.C. Levasseur, Edition Ellipse Paris, 533-549.

- Clegg S.R., Coyne K.P., Dawson S., Spibey N., Gaskell R.M, Radford A.D., 2012, *Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers*, Veterinary Microbiology 157, 78-85.

- Clegg S.R., Coyne K.P., Parker J., Dawson S., Godsall S.A., Pinchbek G., Cripps P.J., Gaskell R.M., Radford A.D., 2011, *Molecular Epidemiology and phylogeny reveal complex spatial dynamics in areas where canine parvovirus is endemic*, Journal of virology, 85, 5, 7892-7899.

- Code Rural et de la Pêche Maritime : *Article R213-2 Créé par Décret 2003-768 2003-08-01 art. 2, annexe JORF, 7 août 2003,* www.legifrance.gouv

- Coleman D.V., Wolfendale M.R., Daniel R.A., Dhanjal N.K., Gardner S.D., Gibson P.E., Field A.M., 1980, *A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy*, The Journal of the Infectious Diseases, Volume 142, 1-8.

- Crawford C., 2010, *Canine and feline parvovirus in animal shelters,* Maddie's Shelter Medicine Program, Proceedings of the western Veterinary Conference, University of Florida, 1-7.

- De Cramer K.G.M., Stylianides E., Van Vuuren M., 2011, *Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus*, Veterinary Microbiology 149, 126-132.

- Decaro N., Elia G., Martella V., Desario C., Di Trani L., Tarsitano E., Tempesta M., Buonavoglia C., 2005, *A real time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvorivus type 2 in the feces of dogs*, Veterinary Microbiology 105, 19-28.

- Chastant S., Freyburger L., Marcheteau E., Thoumire S., Ravier J.F., Reynaud K., 2013, *Fermeture de la barrière intestinale chez le chiot*, Le Point Vétérinaire, 336, 58-62.

- Decaro N., Campolo M., Desario C., Elia G., Martella V., Lorusso E., Buonavoglia C., 2005, *Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection*, Biologicals 33, 261-267.

- Decaro N., Desario C., Elia G., Campolo M., Lorusso A., Mari V., Martella V., Buonavoglia C., 2006, *Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemm*a, Vaccine, 25, 1161-1166.

- Gayrard V., 2007, Physiologie *de la reproduction des mammifères*, Cours de physiologie ENVT 1ère année

- Gordon J.C. et Angrick E.J., 1986, Canine *parvovirus environnemental effects on infectivity*, American Journal of Veterinary Research, 47, 7, 1464-1467.

- Hoare M., DeBouck P., Wiseman A., 1997, *Immunogenicity of a low-passage, high-titer modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies*, Vaccine, 15, 3, 273-275.

- Houston D.M, Ribble C.S., Head L.L., 1996, *Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991),* Journal of the American Veterinary Medical Association, 208, 542-546.

- Juraschko K., Meyer-Lindenberg A., Distl O., 2003, *Analysis of systematic effects on congenital sensorineural deafness in German Dalmatian Dogs*, The Veterinary Journal, 166, 2, 164-169.

- Kapil S., Cooper E., Lamm C., Murray B., Rezabek G., Johnston L., Campbell G., Johnson B.,2007, *Canine parvovirus type 2c et 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007*, Journal of Clinical Microbiology, 4044-4047.

- Kutzler M. et Peterson M.E., 2011, *Small animal pediatrics, the first 12 Months of life*, Elsevier Saunders, Saint-Louis, 106-107.

- Larson B.L., Heary H.L., Devery J.E, 1980, *Immunoglobulin production and transport by the mammary gland*, Journal of Dairy Science, 63, 665-671.

- Levieux D., 1984, *Transmission de l'immunité passive et colostrale : le point des connaissances*, Jarrige R. Physiopathologie et pathologie périnatales chez les animaux de ferme, INRA Paris, 345-369.

- Mila H., Feugier A., Grellet A., Anne J., Gonnier M., Martin M., Rossig L., Chastant-Maillard S., 2014, *Inadequate immune transfert in puppies: definition, risk factors and prevention in a large multi-breed kennel*, Preventive Veterinary Medicine, 116, 209-213.

- Martella V., Cavalli A., Decaro N., Elia G., Desario C., Campolo M., Bozzo G., Tarsitano E., Buonavoglia C., 2005, *Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine Parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies*, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12, 10, 1243-1245.

- Meunier P.C., Cooper B.J., Appel M.J.G., Slauson D.O., 1985, *Pathogenesis of canine enteritis: the important of viremia*, Veterinary Pathology, 22, 60-71.

- Monnet Eric, 2001, *Diagnostic de la parvovirose canine, étude bibliographique et expérimentale*, Thèse Doct Vet, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 127 pages.

- Moraillon A., 1994, *Canine parvovirus infection, la parvovirose canine*, Recueil de Médecine Vétérinaire, 170, 653-662.

- Moraillon R., 1982, *La parvovirose canine*, Recueil de Médecine Vétérinaire, 158, 687-705.

- Moraillon R., 1994, *Actualités sur la parvovirose canine*, Point vétérinaire, 25, 927-932.

- Nandi S. et Kumar M., 2010, *Canine Parvovirus : Current Perspective*, Indian Journal of Virology, 21, 31-44.

- Natali A., Valcavi P., Medici MC., Dieci E., Montali S., Chezzi C., 1997, *Cytomegalovirus infection in an Italian population: antibody prevalence, virus excretion and maternal transmission*, The New Microbiologica, 20, 123-133.

- Parrish C. et Carmichael L., 1986, *Characterization and recombination mapping of an antigenic and host range mutation of canine parvovirus*, Virology, 148, 1, 121-132.

- Petit A., 2009, *Evolution du parvovirus canin et conséquences sur le diagnostic et la prophylaxie médicale, étude bibliographique*, Thèse Doct vet, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 165 pages.

- Phan Tung G., 2012, *Acute diarrhea in West African children: diverse enteritic viruses and a novel parvovirus genus*, Journal of Virology, 88, 1024-1030.

- Pollock R.H.V et Carmichael L.E., 1982, *Maternally derived immunity to canine parvovirus infection : Transfer, decline, and interference with vaccination*, Journal of the American Veterinary Association, 180, 27-42.

- Pollock R.H.V et Coyne M.J, 1993, *Canine parvovirus*, Veterinary Clinics of North America, Small animal practice, 23, 555-568.

- Pratelli A., Cavalli A., Normanno G., De Palma M.G., Pastorelli G., Martella V., Buonavoglia C., 2000, *Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified-live variant (CPV2-b)*, Journal of Veterinary Medicine, B47, 273-276.

- Schäfer Somi S., Bar Schadler S., Aurich J.E., (2005), *Proteinuria and hemoglobinuria in the neonatal dogs*, Veterinary Record, 157, 378-382.

- Schmitz H., Kampa D., Doerr H.W., Hillemanns H.G., Würtele A., 1977, *IgM antibodies to cytomegalovirus during pregnancy*, Archives of Virology, 53, 177-184

- Siedek E.M., Schmidt H., Sture GH., Raue R., 2011, *Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c*, Berliner und Münchener Tierarztliche Wochenschrift, 124, 58-64.

- Spibey N., Greenwood N.M., Sutton D., Chalmers W.S.K, Tarpey I., 2008, *Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus*, Veterinary Microbiology, 128, 48-55.

- Stern H., Tucker S.M, 1973, *Prospective study of cytomegalovirus Infection in pregnancy*, British Medical Journal, 2, 268- 270.

- Tizard I.R., 2013, *Veterinary immunology,* ninth edition, Elsevier Saunders, Saint-Louis, 568 pages.

- Xie H.L., Wang Z., Cui S.J., Zhang C.F., Cui Y.D., 2010, *The epitope of the VP1 protein of porcine parvovirus*, Journal of Virology, 7, 161.

BROUSSOU DIANE

Titre : Etude de l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 par la chienne pendant la gestation et la lactation

L'infection par le parvovirus canin de type 2 (CPV2) est responsable de taux élevés de mortalité chez les chiots. Le contrôle de l'infection virale par la désinfection et l'isolement des malades reste difficile. L'objectif de ce travail était d'évaluer le rôle épidémiologique des chiennes reproductrices dans la circulation virale. La fréquence d'excrétion et la charge virale excrétée dans les fèces ont été évaluées par PCR sur écouvillon fécal chez 41 chiennes en gestation et 32 chiennes en lactation, dans un élevage canin français multiracial. 80% des chiennes en gestation et 100% des chiennes en lactation ont excrété au moins une fois du CPV-2. Les charges virales excrétées étaient plus importantes en lactation qu'en gestation. Bien qu'à jour de leur vaccination, les chiennes excrètent du parvovirus canin pendant la gestation et la lactation. Cette étude montre que les chiennes sont un foyer pour leurs chiots. L'excrétion par les chiennes après le sevrage des chiots, hors période de reproduction et par les mâles permettrait de compléter l'évaluation du rôle des adultes dans la circulation virale.

Mots clefs : Parvovirus CPV-2- Excrétion- Chiennes- Rôle épidémiologique- Gestation– Lactation

Titer : Study of the excretion of the canine parvovirus (CPV-2) by the bitch during pregnancy and lactation

Canine parvovirus is responsible for high mortality rates in puppies. The control of the infection by disinfection and isolation of patients is difficult. The aim of our study was to evaluate the dam's epidemiological role in viral circulation. The frequency of excretion and the viral load in feces were evaluated by PCR on rectal swabs of 41 pregnant and 32 lactating dams in a large French multi-breed kennel. 66% of pregnant dogs and 13% of lactating bitches excreted CPV-2, with higher excreted viral loads during lactation than during gestation. This study demonstrates that correctly vaccinated adult female dogs excrete a CPV-2 strain during pregnancy and lactation and are therefore a source of contagion for their puppies. The excretion by bitches after weaning until the next breeding period and by males would be interesting to go further into the role of adults in viral circulation.

Key words: canine Parvovirus CPV-2- Excretion- Bitches- Epidemiological role- Pregnancy- Lactation