

EXCRÉTION FÉCALE DU PARVOVIRUS ET DU CORONAVIRUS CHEZ LE CHIOT : CINÉTIQUE D'EXCRÉTION ET EXPRESSION CLINIQUE LORS DE CO-INFECTION SPONTANÉE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

HANSE Barbara

Née, le 16 novembre 1991 à Niort (79)

Directeur de thèse : Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD

JURY

PRESIDENT :
M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD
M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :
Mme Hanna MILA
M. Aurélien GRELLET

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Ingénieur de recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mme Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VÉTÉRINAIRE :</u> M. PICAVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE. :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoit, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE. :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET

Chef de service, Professeur des Universités, Praticien hospitalier
Virologie,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Sylvie CHASTANT-MAILLARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie de la Reproduction,

Qui a encadré ce travail et l'a gratifié d'une relecture attentive,
Pour sa patience et sa disponibilité,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie infectieuse,

Qui a très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse,
Sincères remerciements.

A Monsieur Aurélien Grellet

Docteur Vétérinaire, ingénieur de recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pour son encadrement pour ce travail, ses compétences statistiques et sa relecture constructive,

Pour sa patience, son soutien et sa bonne humeur,
Sincères remerciements.

A Madame Hanna Mila

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pour la réalisation et l'encadrement des prélèvements,
Pour son aide et sa bonne humeur,
Sincères remerciements.

Aux étudiants ayant réalisé les prélèvements de cette étude,

Sincères remerciements.

Au laboratoire Scanelis (Colomiers),

Pour avoir analysé l'ensemble de nos échantillons,
Sincères remerciements.

A Royal Canin,

Pour avoir financé cette étude expérimentale,
Sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

LISTES DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	13
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : PATHOGENICITE DE DEUX ENTEROPATHOGENES VIRAUX	
CANINS.....	14
I. Physiopathogénicité	16
II. Expression clinique	20
III. Réaction immunitaire post-infection	21
IV. Facteurs de variation du pouvoir pathogène	23
1. Facteurs liés à l’hôte	23
1.1. Immunité : Protection maternelle	23
1.1.1. Immunité systémique : transfert passif de l’immunité	23
1.1.2. Immunité locale	24
1.2. Immunité : vaccination	26
1.3. Co-infections.....	27
1.4. Age.....	28
1.5. Race, taille, génétique	28
1.6. Sexe	29
2. Facteurs liés à l’agent pathogène	29
3. Facteurs liés à l’environnement.....	29
PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE	31
I. Matériels et méthodes	31
1. Zootechnie de l’élevage étudié.....	31
1.1. Structure et gestion des animaux à la reproduction.....	31
1.2. Protocole de prophylaxie sanitaire	31
1.3. Protocole de prophylaxie médicale	32
2. Chiots inclus dans l’étude	32
3. Données cliniques.....	32
3.1. Collecte des données cliniques	32
3.2. Traitement des données cliniques.....	33
3.2.1. Signes de morbidité et score de morbidité	33
3.2.2. Hospitalisation	34
4. Prélèvements et PCR	34
4.1. Prélèvements.....	34
4.2. Excrétion virale	34

4.3.	Seuils de la méthode PCR CPV-2	35
4.4.	Seuils de la méthode RT-PCR CCV	35
4.5.	Traitements des données PCR	36
5.	Analyses statistiques	37
II.	Résultats	39
1.	Description de la population étudiée	39
2.	Etude de l'excrétion virale	39
2.1.	Description des résultats PCR	39
2.2.	Début d'excrétion	41
2.3.	Pic d'excrétion	42
2.4.	Charge globale excrétée au cours du temps (AUC).....	44
2.5.	Profil d'excrétion au cours du temps	44
2.6.	Cinétique d'excrétion par portée.....	48
3.	Impact clinique de l'infection virale.....	51
3.1.	Description des signes cliniques et cinétique d'apparition	51
3.1.1.	<i>Hyperthermie, perte de poids et diarrhée</i>	51
3.1.2.	<i>Scores cliniques</i>	53
3.1.3.	<i>Hospitalisation</i>	54
3.2.	Relation entre les charges virales et les signes cliniques	55
3.2.1.	<i>Charges en parvovirus excrétées et clinique</i>	55
3.2.2.	<i>Impact des charges en coronavirus excrétées</i>	57
3.3.	Facteurs de variation des signes cliniques	58
3.3.1.	<i>Effet du format racial</i>	58
III.	Discussion	60
1.	Les limites de l'étude	60
1.1.	Population étudiée	60
1.2.	Données cliniques collectées	61
1.3.	Données PCR	62
2.	Bilan des résultats et comparaison aux données de la littérature	62
2.1.	Charges excrétées en parvovirus et coronavirus	62
2.2.	Cinétique d'excrétion en parvovirus et coronavirus	63
2.3.	Effet de la charge virale sur la morbidité	65
2.4.	Effet du format racial.....	66
2.4.1.	<i>Charge excrétée, expression clinique et format racial</i>	66
2.4.2.	<i>Hyperthermie et format racial</i>	67
2.5.	Coopération entre les deux virus.....	67
3.	Conséquences pratiques et perspectives	67
	CONCLUSION	70
	BIBLIOGRAPHIE	71

LISTES DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Muqueuse intestinale et son système immunitaire (A, B et C : voies d'entrée des antigènes). Adapté de Amrouche (2005)	16
<u>Figure 2</u> : Tissus cibles des virus entériques, d'après Thiry (2016)	18
<u>Figure 3</u> : Titres en anticorps neutralisants anti-CPV-2 chez 14 chiens infectés naturellement. D'après Hirasawa et al 1987.	21
<u>Figure 4</u> : Titres en IgG et IgM plasmatiques anti-CCV chez des chiens (N=5) infectés expérimentalement (souche CCV-C54) en fonction du temps. D'après Tennant et al 1991	22
<u>Figure 5</u> : Concentrations moyennes en anticorps anti-CPV-2 dans les fèces chez des chiens (N=3) après inoculation de CPV-2 vivant par voie orale (IgG ▲ IgM● et IgA■). D'après Nara et al (1983).....	25
<u>Figure 6</u> : Titres en IgM, IgG et IgA dans les sécrétions duodénales anti-CCV chez des chiens (N=5) infectés expérimentalement (souche CCV-C54) en fonction du temps. D'après Tennant et al 1991 ...	26
<u>Figure 7</u> : Schéma de la structure du bâtiment de maternité de l'élevage	31
<u>Figure 8</u> : Exemple d'une fiche de suivi utilisée lors de l'étude (HR=Heart Rate, RR=Respiratory Rate, D21=J21)	33
<u>Figure 9</u> : Protocole du suivi clinique et de prélèvements des chiots de J0 à J56	34
<u>Figure 10</u> : Seuils utilisés pour le PCR CPV-2 et la RT-PCR CCV	36
<u>Figure 11</u> : Schéma théorique d'une excrétion virale avec les points d'intérêt de notre étude	37
<u>Figure 12</u> : Représentation des semaines d'avant (Sem Av) et d'après (Sem Ap) par rapport au jour de PCR.	37
<u>Figure 13</u> : Distribution des charges virales en CPV-2 (10^{\wedge}) tous âges confondus (J28-J56), n=725 prélèvements.	40
<u>Figure 14</u> : Distribution des charges virales en CCV (10^{\wedge}) tous âges confondus (J28-J56), n=725 prélèvements.	40
<u>Figure 15</u> : Proportion de chiots excréteurs pour la première fois en CPV-2 et CCV au cours du temps (Jour de PCR), n=725 prélèvements.	41
<u>Figure 16</u> : Distribution du début d'excrétion virale en CPV-2 en fonction du format racial, n=725 prélèvements.	42
<u>Figure 17</u> : Distribution du pic d'excrétion en CPV-2 et CCV au cours du temps (jour de PCR), n=725 prélèvements.	43
<u>Figure 18</u> : Distribution du pic d'excrétion en CPV-2 au cours du temps en fonction du format racial, n=725 prélèvements.	43
<u>Figure 19</u> : Charge globale en coronavirus excrétée en fonction du format racial = AUC moyenne ($\log 10$) \pm écart-type, n=725 prélèvements.	44
<u>Figure 20</u> : Charge moyenne (10^{\wedge}) excrétée en CPV-2 et en CCV au cours du temps (moyenne \pm écart-type, n=725 prélèvements.	45
<u>Figure 21</u> : Evolution de la charge en parvovirus (10^{\wedge}) excrétée en fonction de l'âge pour 10 chiots pris au hasard dans l'échantillon étudié.....	45

<u>Figure 22</u> : Evolution de la charge en coronavirus (log 10) excrétée en fonction de l'âge pour 10 chiots pris au hasard dans l'échantillon étudié.....	46
<u>Figure 23</u> : (a) : Proportion de chiots en fonction du nombre de PCR consécutives ayant une charge en parvovirus $\geq 10^9$ copies/écouvillon ; (b) ayant une charge en coronavirus $\geq 10^9$ copies/écouvillon, n=145 chiots.....	46
<u>Figure 24</u> : Charge moyenne excrétée (10^{\wedge}) en CPV-2 et CCV sur toute la période d'étude (J28-J56) en fonction de la taille de la race (moyenne \pm écart-type), n=725 prélèvements.	47
<u>Figure 25</u> : Charge moyenne excrétée (10^{\wedge}) en CPV-2 en fonction de la taille de la race (moyenne \pm écart-type).....	48
<u>Figure 26</u> : Proportion moyenne de chiots de la portée excréant une charge en parvovirus $\geq 10^6$ copies/écouvillon au cours du temps (moyenne \pm écart-type).	49
<u>Figure 27</u> : Proportion moyenne de la portée excréant une charge en coronavirus $\geq 10^6$ copies/écouvillon au cours du temps (moyenne \pm écart-type).	49
<u>Figure 28</u> : (a) Fréquence des signes cliniques hebdomadaires (pic d'hyperthermie $T^{\circ}C > 39^{\circ}C$, perte de poids GMH-, diarrhée D+) (b) : Association des signes cliniques hebdomadaires sur toute la période S4-S8, n=145 chiots.	51
<u>Figure 29</u> : Durée des signes cliniques (hyperthermie pic $T^{\circ}C > 39$, diarrhée D+, perte de poids GMH-) en nombre de semaines.	52
<u>Figure 30</u> : Evolution de la proportion de chiots ayant présenté un signe clinique hebdomadaire (pic d'hyperthermie $T^{\circ}C > 39^{\circ}C$, perte de poids GMH-, diarrhée D+) en fonction de l'âge, n=145 chiots.....	53
<u>Figure 31</u> : Evolution de la proportion de chiots ayant présenté au moins un signe clinique hebdomadaire en fonction de la semaine de S4 à S8, n=145 chiots	54
<u>Figure 32</u> : Evolution du taux d'hospitalisation au cours des semaines de S4 à S8.....	55
<u>Figure 33</u> : Proportion de chiots ayant présenté au moins un signe clinique durant la semaine d'avant (Av) le jour de PCR, en fonction de la charge excrétée en parvovirus (10^{\wedge}).....	55
<u>Figure 34</u> : Proportion de chiots ayant été hospitalisés (H+) durant la semaine d'avant (Av) et d'après (Ap) le jour de PCR en fonction de la charge excrétée en parvovirus (10^{\wedge})	57
<u>Figure 35</u> : Proportion de chiots ayant présenté au moins un signe clinique durant la semaine d'avant (Av) le jour de PCR, en fonction de la charge excrétée en coronavirus (10^{\wedge}), n=145 chiots	58
<u>Figure 36</u> : Proportion de chiots ayant présenté un pic d'hyperthermie en fonction du format racial sur toute la période S4 à S8.....	59
<u>Figure 37</u> : Proportion de chiots ayant présenté une perte de poids en fonction du format racial sur toute la période S4 à S8.	59

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Répartition des effectifs en fonction de la race.	39
<u>Tableau 2</u> : Répartition des résultats PCR CPV-2 et CCV par rapport aux gammes de quantification. .	41
<u>Tableau 3</u> : Principales observations et facteurs de variation influençant les charges excrétées en parvovirus et coronavirus.....	50
<u>Tableau 4</u> : Evolution des proportions de chiots présentant un signe clinique hebdomadaire (pic d'hyperthermie >39°C, une perte de poids GMH-, une diarrhée D+) en fonction de l'âge des chiots..	53
<u>Tableau 5</u> : Valeurs seuils de la charge excrétée (quantitative « CPV-2 » ou en 10 [^]) en parvovirus....	56

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AG : Antigène

AOM : Anticorps d'origine maternelle

ARN : Acide ribonucléique

AUC : Aire sous la courbe

CCV : Coronavirus canin

CPV -2 : Parvovirus canin de type 2

D+ : Diarrhée

Ex : Chiot excréteur

GMH : Gain moyen hebdomadaire

H+ : Hospitalisation

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline (G, Y ...)

IH: Inhibition de l'hémagglutination

J1...J56 : Jour 1...Jour 56

L : Chiot large, de grande race

NEx : Chiot non excréteur

S : Chiot small, de petite race

S1...S8 : Semaine 1...Semaine 8

SD : Seuil de détection en PCR

SQ : Seuil de quantification en PCR

SIRS : Syndrome inflammatoire à répercussion systémique

T°C : Température rectale en degré Celsius

TGEV : Transmissible gastroenteritis coronavirus

TNF : Tumor necrosis factor

INTRODUCTION

Les diarrhées du chiot, notamment de sevrage, sont un phénomène complexe d'origine multifactorielle (Grellet et al, 2014). Il existe en effet différentes causes, à la fois infectieuses (virus, bactéries de la flore digestive, parasites ...) et non infectieuses (alimentation, stress, conduite de l'élevage...). De plus, les chiots sont fréquemment infectés simultanément par différents agents infectieux. Inversement, la présence d'un agent pathogène n'est pas systématiquement associée à des troubles digestifs. En effet, outre l'agent pathogène en lui-même (souche, charge ...), sa pathogénicité et son impact clinique dépendent également de paramètres physiologiques comme la génétique, l'âge ou le statut immunitaire du chiot. Lors de diarrhée sur un ou plusieurs chiots, une approche multidisciplinaire est donc nécessaire pour comprendre quels sont les facteurs en cause, les animaux les plus à risques et les mesures environnementales à mettre en place pour améliorer la santé digestive des chiots.

Le parvovirus canin de type 2 (CPV-2) est la cause virale la plus fréquente de diarrhée chez le chiot, dès l'âge d'un mois (Wells et Hepper, 1999). Néanmoins, une étude réalisée sur 266 chiots a révélé que 55,3% d'entre eux étaient pluri-infectés, et 28,6% des chiots excréteurs de CPV-2 étaient également excréteurs d'autres pathogènes. Certains de ces agents infectieux peuvent interagir avec le CPV-2 et aggraver les signes cliniques, comme cela pourrait être le cas lors de co-infection entre le coronavirus (CCV) et le CPV-2 (Appel 1988). Les mesures de prévention passent alors par une prophylaxie médicale et par la mise en œuvre de protocoles de gestion d'élevage adaptés.

Dans le but de mieux comprendre la circulation de ces virus, l'étude présentée dans ce document s'intéresse à une co-infection spontanée de ces deux agents pathogènes, parvovirus et coronavirus, chez des chiots de races diverses dans un élevage. Ce travail évalue l'excrétion virale fécale en période pédiatrique, mesurée par Polymerase Chain Reaction (PCR) sur écouvillon rectal, afin de comprendre les cinétiques d'évolution des charges des chiots au cours du temps, ainsi que d'évaluer les répercussions cliniques associées. Les facteurs de variation tels que le format racial, l'âge des chiots ... seront également étudiés.

Dans un premier temps, à travers une synthèse bibliographique, nous présenterons les deux entéropathogènes viraux précédemment cités, leur pathogénicité et les signes cliniques qu'ils peuvent engendrer. Nous verrons également l'importance des mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une infection, ainsi que les facteurs favorables ou défavorables à l'infection. La seconde partie de ce document sera consacrée à notre étude expérimentale, menée sur 147 chiots suivis de l'âge de 0 jour à 56 jours.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : PATHOGENICITE DE DEUX ENTEROPATHOGENES VIRAUX CANINS

Le virus responsable de la parvovirose canine est appelé parvovirus canin de type 2 (canine parvovirus type 2, CPV-2). Il appartient à la famille des *Parvoviridae*, sous-famille des *Parvovirinae*, genre *Parvovirus*. Ce parvovirus canin est un petit virus (25 nm de diamètre), non enveloppé, à symétrie icosaédrique et à ADN monocaténaire. Il est constitué d'une capsidie sphérique composée de trois protéines de structure VP1, 2 et 3, VP2 étant responsable de l'antigénicité du virus (Decaro, 2016).

La souche CPV-2 est apparue chez le chien à la fin des années 1970, probablement suite à une adaptation du virus de la panleucopénie féline ayant permis un changement d'hôte (Decaro et Buonavoglia, 2012). Au début des années 1980, deux variants antigéniques, CPV-2a et CPV-2b, sont apparus et ont progressivement remplacé la souche originelle de CPV-2, et un troisième variant, CPV-2c, a été décrit en Italie en 2000 (Decaro 2011a). Ces trois variants antigéniques ne diffèrent que par quelques substitutions d'acides aminés sur la protéine de capsidie VP2 (Decaro, 2016) et sont aujourd'hui distribués de façon variable dans le monde entier. Deux études épidémiologiques européennes ont montré que les variants CPV-2b et c sont les plus fréquents en France (Decaro et Buonavoglia, 2012).

Grellet et al (2014) ont mesuré une prévalence en France du CPV-2, tous variants confondus, de 14,7% dans 29 élevages français (266 chiots âgés de 5 et 14 semaines) et une étude réalisée au Royaume-Uni (Godsall et al, 2010) a montré que sur 355 chiens d'origine et d'âges divers présentés dans les cliniques PDSA PetAid pour diarrhée, 58% d'entre eux excrétaient CPV-2.

Le coronavirus canin a été quant à lui découvert en 1971, à la suite d'un épisode de gastro-entérite dans un chenil militaire en Allemagne, avec une morbidité très forte mais peu de mortalité (Keenan et al, 1976). En 1974, Binn et son équipe (d'après Decaro 2008a) isolent le virus responsable et démontrent son appartenance à la famille des *Coronaviridae*, genre *Alphacoronavirus*. Les coronavirus sont répartis en trois groupes selon leur proximité antigénique, structurale et génétique (Enjuanes et al, 2000). Le coronavirus canin entéritique (CCV) est un coronavirus du groupe 1 à la différence du coronavirus canin à tropisme respiratoire, appartenant au groupe 2. On distingue de plus deux génotypes de CCV, I et II (Pratelli et al, 2003a).

Le CCV est un gros (en moyenne 100 nm) virus enveloppé à ARN monocaténaire positif contenu dans une nucléocapsidie hélicoïdale. Le nom de coronavirus vient de son aspect en microscopie électronique : les protéines structurales de l'enveloppe forment une couronne (« corona » en latin) autour de la particule virale. On dénombre notamment 4 protéines de structure : S (spike), E (enveloppe), M (membrane), and N (nucléocapsidie)

(Decaro 2011b). L'hémagglutinineestérase (HE) se retrouve uniquement chez les coronavirus du groupe 2 mais est absente chez les autres, dont le CCV.

Le coronavirus canin CCV est également fréquemment retrouvé dans le tube digestif des chiots. En effet, selon Grellet et al (2014), 20,3% des chiots étaient excréteurs de CCV et seulement 0,4% des chiots présentaient une infection mixte CCV-CPV-2 ; Godsall et al (2010) a observé une prévalence de 8% du CCV sur 355 chiens atteints de diarrhée.

L'utilisation de la reverse transcription PCR (RT-PCR) quantitative différenciant les deux génotypes I et II a permis de déterminer la prévalence de chacun d'entre eux. Une étude réalisée sur des chiots en diarrhée a identifié le CCV génotype I dans 14,5% des cas, le CCV génotype II dans 8,7% et les deux génotypes dans 76.8% des cas (Pratelli et al, 2004a).

I. Physiopathogénicité

La contamination des chiots pour les deux virus est essentiellement oro-fécale. Elle se fait donc par ingestion d'un virus, suite au contact avec un animal infecté (pouvant présenter des signes cliniques ou être porteur asymptomatique) ou indirectement par contact avec du matériel ou des aliments souillés par des fèces. Les selles constituent la principale source du CPV-2 dans l'environnement. Ce virus est très résistant (car non-enveloppé) et peut rester infectant pendant des mois dans l'environnement. La fourrure, par le biais du léchage, peut également être une source de parvovirus canin (Petit, 2010). Les chiennes, même correctement vaccinées, peuvent également excréter le virus pendant la gestation et la lactation (Broussou, 2014). Les manipulations et la circulation des animaux en élevage doivent donc être réfléchies afin de limiter la dissémination virale.

La période d'incubation est d'environ 3-5 jours (Decaro et Buonavoglia, 2012). Le CPV-2 ne se réplique que dans les noyaux des cellules à fort index mitotique (lymphocytes des organes lymphoïdes, moelle osseuse, entérocytes des cryptes intestinales...) (Figure 1), uniquement durant la phase S du cycle cellulaire (Pratelli et al, 1999 ; Martella et al, 2005a).

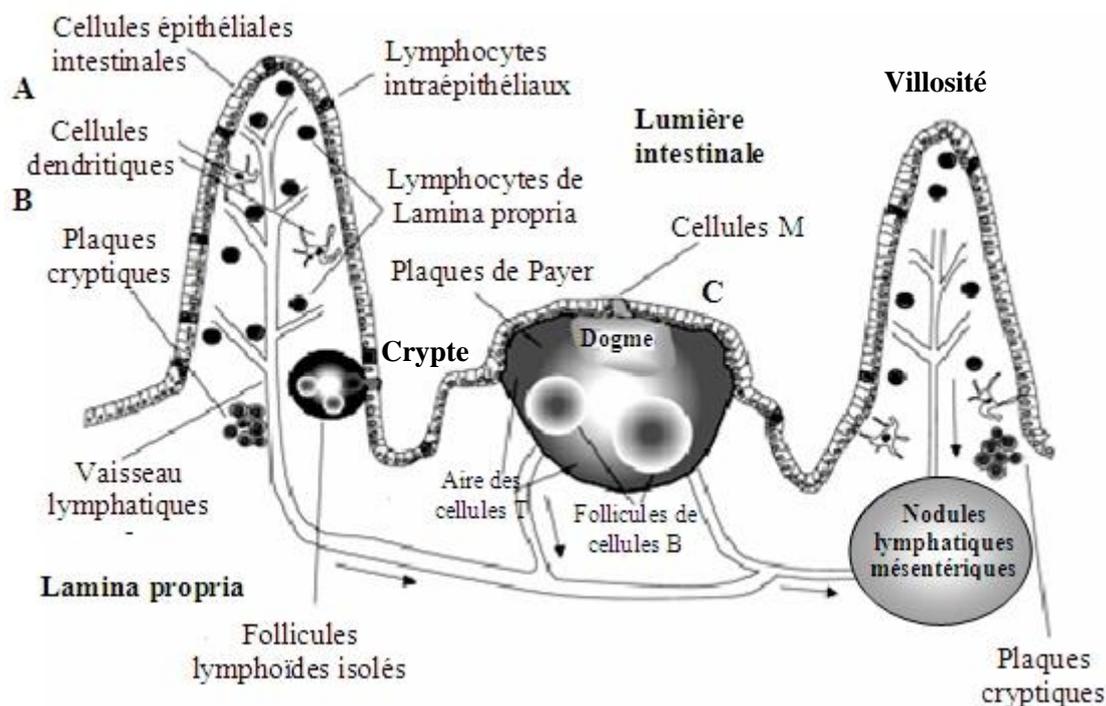


Figure 1 : Muqueuse intestinale et son système immunitaire (A, B et C : voies d'entrée des antigènes). Adapté de Amrouche (2005)

Après pénétration dans l'organisme, le virus CPV-2 se multiplie principalement dans les tissus lymphoïdes oro-pharyngés (Potgieterl et al, 1981), puis gagne le thymus, la rate, la moelle osseuse, les nœuds lymphatiques mésentériques, l'épithélium intestinal et les plaques de Peyer. La virémie, sous forme libre ou de lymphocytes infectés (Meunier et al,

1985a) est détectable dès 1 à 5 jours post infection (Goddard et Leisewitz, 2010) et est longue : le virus peut être détecté jusqu'à 60 jours par PCR en temps réel (Goddard et Leisewitz, 2010). A la suite de cette virémie, les cellules des cryptes de l'intestin grêle, principalement celles de l'iléon et du jéjunum sont colonisées et subissent une lyse (Figure 2). Plus la virémie est importante, plus la gravité des lésions intestinales et de la maladie en conséquence le seront également (Meunier et al, 1985b). Le cycle de multiplication du CPV-2 est résumé dans l'encadré 1.

La lyse des entérocytes va entraîner une nécrose de l'épithélium digestif et une atrophie des villosités intestinales. L'intestin va alors perdre ses capacités d'absorption, ce qui provoque une diarrhée, pouvant être associée à des vomissements voire un état de SIRS (Syndrome Inflammatoire à Répercussion Systémique) (Macartney et al, 1984). La réplication intense du virus dans les organes lymphoïdes et dans la moelle osseuse entraîne également une lyse et une nécrose des cellules lymphoïdes. Des modifications hématologiques majeures peuvent donc être observées 4 à 6 jours post infection, telles qu'une lymphopénie, une neutropénie voire une panleucopénie. Dans certains cas, une neutrophilie est observée consécutivement à des infections par des bactéries opportunistes (Decaro et al, 2011a).

Chez les chiens ayant survécu à une infection, une immunité solide se met en place. L'individu est protégé contre de nouveaux signes cliniques et l'excrétion virale n'est plus détectée dans les selles (Delsarte, 2009).

Chez les chiots nouveau-nés, jusqu'à 2-3 semaines, le CPV-2 est capable de façon sporadique de se reproduire dans les cellules myocardiques, engendrant une myocardite sévère. Cette forme est maintenant très rarement observée car la plupart des chiots de cet âge sont protégés par leurs anticorps d'origine maternelle (Decaro et al, 2011a).

Encadré 1 : Les phases du cycle de réplication du CPV2 (Fields et al, 2007)

- Attachement à un récepteur de surface de la cellule cible grâce à une protéine de surface (VP1 et VP2)
- Pénétration : entrée par endocytose
- 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) pour former un ADN double brin temporaire. Une phase de transcription et de traduction du génome viral permet alors de produire de nouvelles protéines virales.
- Production de nouveaux virions : réplication directe formant de multiples copies d'ADN viral et assemblage des différents éléments viraux dans le noyau de la cellule hôte.
- Excrétion des virions par lyse de la cellule hôte, d'où la forte virulence du CPV-2.

Le CCV a également pour cellules cibles les entérocytes de l'intestin grêle. La période d'incubation est de 1-2 jours (Pratelli, 2006). Après ingestion, le CCV va résister au passage dans l'estomac et atteint le duodénum environ 2 jours après l'ingestion. Il infecte alors les entérocytes matures au niveau des microvillosités (Figure 2). Seuls les entérocytes (localisés dans les deux tiers supérieurs de la muqueuse) sont contaminés, les cellules des cryptes ne sont jamais touchées (Licitra, 2014), contrairement au parvovirus.

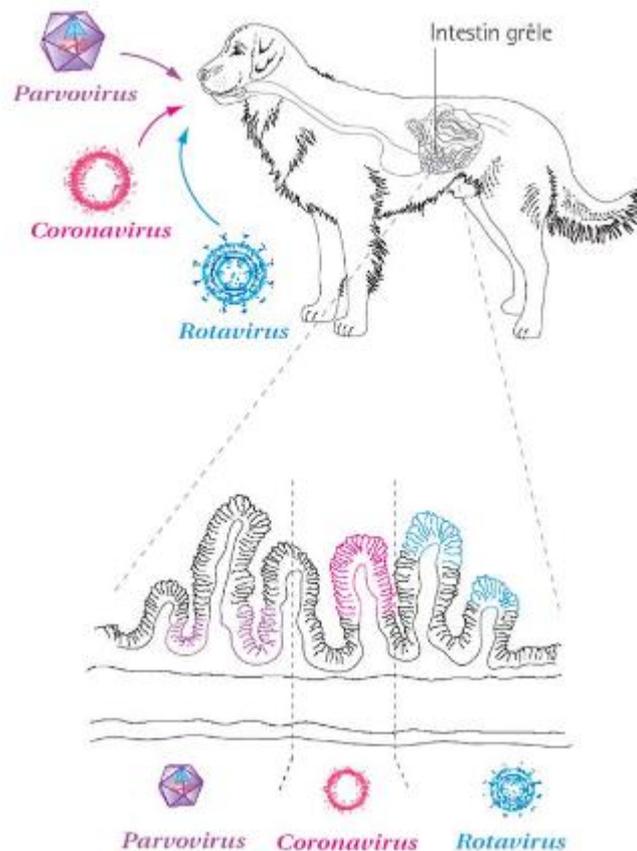


Figure 2 : Tissus cibles des virus entériques, d'après Thiry (2016)

Tennant et al (1991) ont également décrit qu'il était possible que le CCV infecte les cellules M de la membrane des dômes des plaques de Peyer et que les cellules M transporteraient le virus de la lumière digestive vers les organes lymphoïdes de la muqueuse intestinale. Le cycle de multiplication du CCV est résumé dans l'encadré 2.

Contrairement au parvovirus, on n'observe pas de virémie, ni d'infection généralisée mais de petites quantités de virus peuvent, par contre, être retrouvées dans les nœuds lymphatiques mésentériques, la rate et le foie (Tennant et al, 1991).

Les entérocytes infectés dégèrent et une desquamation de l'épithélium intestinal et une abrasion des villosités sont alors observées, principalement au niveau du duodénum et du jéjunum, qui sont les sites préférentiels de l'infection (Pratelli et al, 2004a). La lumière intestinale se remplit de débris cellulaires et le manque d'entérocytes matures altère l'intégrité de la barrière intestinale. Ce changement de la morphologie intestinale est alors à

l'origine des signes cliniques tels que la diarrhée et la déshydratation. En réponse au déficit d'entérocytes dans les villosités, on observe une augmentation de l'activité mitotique des entérocytes des cryptes, qui ne sont pas touchées par le virus, qui migrent vers le sommet des villosités et remplacent les cellules détruites (Licitra et al, 2014). Les villosités sont ainsi restaurées, environ 7 jours après l'infection de l'intestin grêle (Appel et al, 1979) et les chiots infectés par CCV se rétablissent rapidement (Decaro et al, 2008a).

Encadré 2 : Les phases du cycle de réplication du CCV (Licitra et al, 2014) :

- Attachement à l'aminopeptidase N de la cellule cible utilisée comme récepteur de surface grâce à la protéine virale S
- Pénétration par endocytose, décapsidation et libération de l'ARN viral
- Traduction du génome viral ARN pour produire l'ARN polymérase puis transcription en un brin d'ARN négatif, lequel est utilisé comme matrice pour la synthèse des brins positifs viraux d'ARNm et de l'ARN génomique. Durant cette phase de réplication, le risque de mutation du génome viral est très important. Une phase de transcription et de traduction du génome viral permet alors de produire de nouvelles protéines virales.
- Production de nouveaux virions : assemblage et maturation des différents éléments viraux dans le réticulum endoplasmique de l'appareil de Golgi grâce à la protéine M, migration par des vésicules de Golgi
- Excrétion des virions par exocytose de la cellule hôte. Le coronavirus canin induit l'apoptose et donc la destruction des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale (Ruggieri et al, 2007).

II. Expression clinique

Chez les chiots âgés d'au moins 1 mois, l'infestation par le parvovirus canin se manifeste cliniquement dans les 4 à 6 jours post infection par une forme gastro-intestinale. Les premiers symptômes sont peu spécifiques : anorexie (le plus fréquent, 98,4% des cas), abattement (54,8%) et hyperthermie (Hirasawa et al, 1987). Plus tard apparaissent des vomissements (54,8%, pouvant provoquer une œsophagite) et une diarrhée (64,9%) de type grêle, souvent absente pendant les premières 24 à 48h de la maladie (Hirasawa et al, 1987). Elle peut être hémorragique (filets de sang rougeâtre ou sang digéré noirâtre, nauséabonde) ou mucoïde (Goddard et Leisewitz, 2010). Une douleur abdominale intense (dos voussé, abdomen tendu, palpation douloureuse) est très souvent rapportée. Les vomissements et la diarrhée entraînent une perte de fluide et de protéines importantes pouvant engendrer une déshydratation et/ou un choc hypovolémique. Un changement de la couleur des muqueuses (pâles pour des animaux anémiés, congestives pour des animaux en choc toxoinfectieux) est alors observé (Ettinger et Feldman, 2009). Enfin, chez les chiots gravement atteints, le risque de développer un choc septique est relativement élevé : la lyse des cellules intestinales favorise en effet les translocations bactériennes et une septicémie de coliformes, pouvant entraîner la mort de l'animal (Goddard et Leisewitz, 2010). Le taux de mortalité varie beaucoup d'une étude à l'autre mais est le plus souvent entre 25 et 45% (Godsall et al, 2010 ; Miranda et al, 2015).

Concernant le coronavirus canin, sa morbidité digestive est très controversée puisque pour certains il serait responsable de diarrhée et pour d'autres non (Decaro et al, 2008a). Ainsi, l'infection peut être asymptomatique ou les animaux peuvent présenter une gastro-entérite bénigne. Les signes cliniques sont alors généralement de l'anorexie, un abattement, une déshydratation, des vomissements et de la diarrhée (Tennant et al, 1991). En effet, la destruction des entérocytes provoque un syndrome de malabsorption, un déficit en enzymes digestives et une fuite hydrique qui entraînent une diarrhée aqueuse, 1-3 jours après l'infection (Pratelli et al, 2006). Les fèces sont mucoïdes ou très liquides. La présence d'une diarrhée hémorragique est relativement rare. Les vomissements sont retrouvés essentiellement le premier jour, le chien ne présente ensuite que de la diarrhée, qui peut persister 3 à 4 semaines (Pratelli et al, 2006). La diarrhée est plus grave chez les chiens co-infectés par les deux génotypes I et II (Decaro et al, 2005a). L'hyperthermie et la leucopénie sont très rares, mais certains chiens ont présenté une lymphopénie après une infection expérimentale avec de fortes doses virales (Appel 1987). Dans de rares cas, la gastro-entérite peut être mortelle.

III. Réaction immunitaire post-infection

Les anticorps contre le parvovirus peuvent être détectés par inhibition d'hémagglutination (IH). Les parvovirus, comme un grand nombre de virus, possèdent des hémagglutinines sur leur enveloppe : ils vont ainsi provoquer l'agglutination des globules rouges. Dans la réaction d'inhibition, les anticorps antiviraux protecteurs se fixent sur le virus et empêchent sa combinaison avec les récepteurs des hématies introduites dans le deuxième temps de la réaction. Le complexe immun ainsi formé neutralise la capacité hémagglutinante du virus et on aboutit à une hémagglutination négative.

A la suite d'une infection naturelle, la réponse humorale se met en place en moins d'une semaine et on peut déjà détecter des anticorps circulants au début de phase clinique, avec un pic de titre en AC neutralisants 14 jours après le début de l'infection (Decaro et al, 2005b). Ainsi, les virus dans le milieu extra-cellulaire sont neutralisés et dès 7-9 jours post-infection, la quantité de virus détectable dans les tissus et les selles est réduite, prévenant ainsi la propagation du virus à d'autres organes. La virémie persisterait tant que le titre en AC neutralisant reste en dessous de 1:40 (Meunier et al, 1985b). C'est donc la production d'anticorps qui est déterminante pour limiter la virémie et la gravité clinique de la maladie (Meunier et al, 1985b).

La guérison est généralement rapide et l'animal conserve un taux d'anticorps à des niveaux protecteurs durant plusieurs années (Hirasawa et al, 1987) (Figure 3).

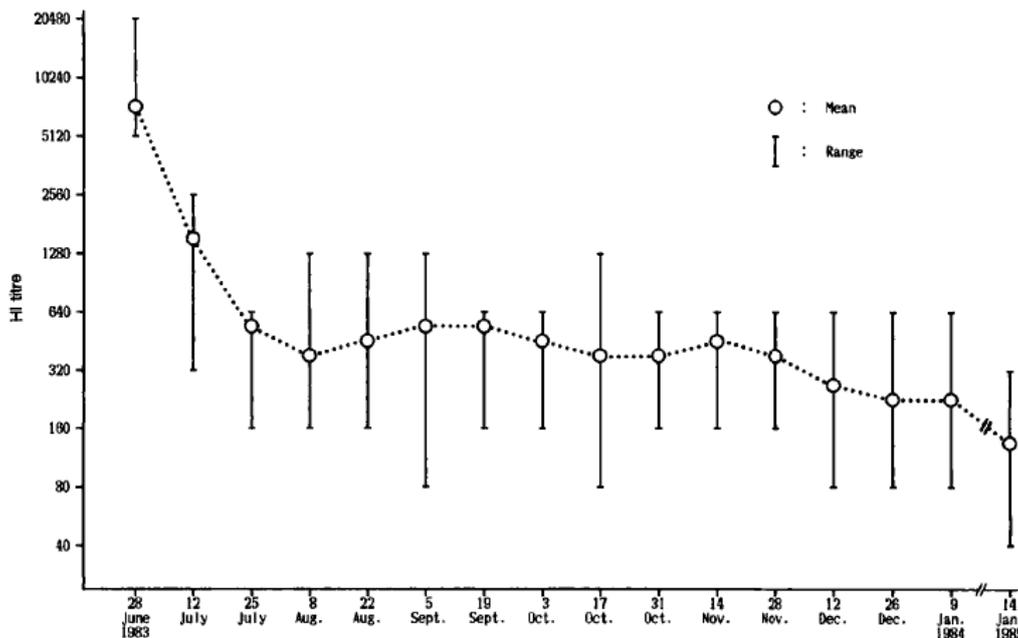


Figure 3 : Titres en anticorps neutralisants anti-CPV-2 chez 14 chiens infectés naturellement. D'après Hirasawa et al 1987.

La diarrhée pourrait également être une conséquence d'une endotoxémie et d'une surproduction de cytokines secondaire à la multiplication du virus et aux septicémies bactériennes, qui proviennent du déséquilibre de la flore intestinale. En effet, la quantité de cytokine pro-inflammatoire TNFalpha (Tumor Necrosis Factor), marqueur d'une réaction

inflammatoire systémique et de l'activation de la cascade de coagulation, est positivement corrélée avec la mortalité des chiots infectés par le parvovirus (Goddard et al, 2010).

Les mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une infection par le CCV ne sont pas encore bien connus (De Castro et al, 2010) mais il est reconnu que la protéine S est l'antigène majeur qui induit les anticorps neutralisants (Gebauer et al, 1991). La protéine M semble également induire des anticorps via une activation du complément, ce qui participe également à la neutralisation du virus (Woods et al, 1987). Il n'y a pas d'anticorps hémagglutinants car le CCV ne possède pas de protéine hémagglutinante (contrairement aux coronavirus du groupe 2). Ceci explique que la recherche d'anticorps par la technique d'inhibition d'hémagglutination ne peut être utilisée, contrairement au CPV-2. Les anticorps apparaissent 10 jours après l'inoculation expérimentale et augmentent jusqu'au 14ème jour, où ils atteignent un plateau. Les sécrétions d'IgM sont observées à partir du 3ème jour post-infection puis ce sont les IgG qui augmentent du 4ème au 7ème jour (Tennant et al, 1991) (Figure 4).

Néanmoins, il a été démontré que des chiens possédant des titres en anticorps neutralisants élevés, via une vaccination, n'étaient pas protégés contre un challenge oral (Tennant 1991). Il semblerait donc qu'il n'y ait pas de niveau protecteur d'anticorps circulant, et que la réponse systémique n'est pas de rôle majeur dans la protection contre le CCV, d'autant que le coronavirus ne présente pas de virémie dans la plupart des études.

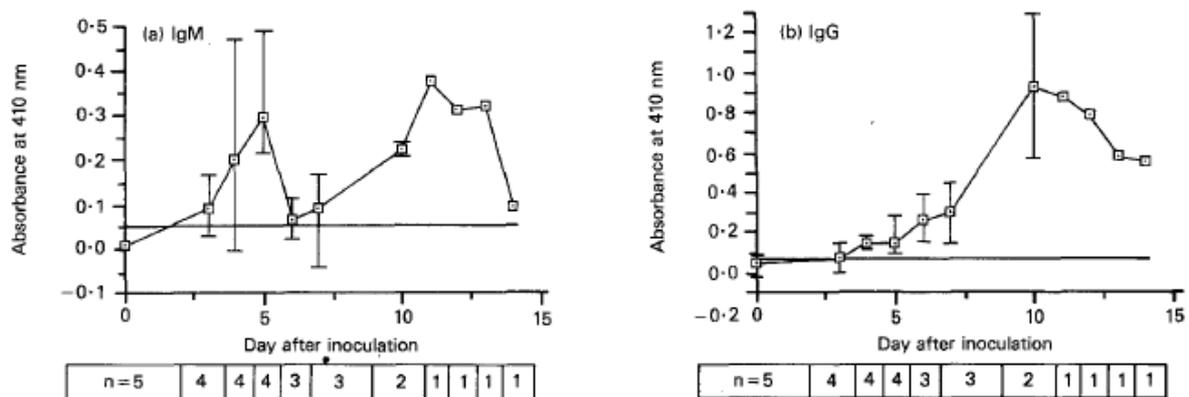


Figure 4 : Titres en IgG et IgM plasmatiques anti-CCV chez des chiens (N=5) infectés expérimentalement (souche CCV-C54) en fonction du temps. D'après Tennant et al 1991

La persistance de l'immunité (qu'il s'agisse des anticorps neutralisants plasmatiques ou de l'immunité locale) est probablement limitée dans le temps et seuls des contacts fréquents avec le virus entretiennent cette immunité.

IV. Facteurs de variation du pouvoir pathogène

Le CPV-2 est classiquement décrit comme responsable d'une gastro-entérite sévère et parfois même mortelle. Néanmoins, chez certains chiots, le virus ne peut provoquer qu'une modification de la qualité des selles sans atteinte de l'état général, voire même n'entraîner aucun signe clinique (Grellet et al, 2014). Parallèlement il a été récemment décrit que des chiennes, même correctement vaccinées, peuvent également excréter le virus pendant la gestation et la lactation, même si celles-ci ne présentent pas de signes cliniques (Broussou, 2014). De même, l'expression clinique du coronavirus varie d'une étude à l'autre. Cette variabilité dans les signes cliniques observés peut être liée à une interaction de trois facteurs : l'hôte, l'agent et l'environnement. L'objectif de cette dernière partie est de passer en revue l'influence de ces différents facteurs sur le pouvoir pathogène du coronavirus et du parvovirus.

1. Facteurs liés à l'hôte

Peu d'études analytiques ont cherché les facteurs prédisposant aux infections par le CPV-2 des chiens en Europe (Godsall et al, 2010 ; Kalli et al, 2010 ; Grellet et al, 2014 ; Miranda et al, 2015) et aucune ne s'est intéressée au CCV seul.

1.1. Immunité : Protection maternelle

1.1.1. Immunité systémique : transfert passif de l'immunité

Le parvovirus et le coronavirus touchent rarement les nouveau-nés en raison des anticorps maternels (si la mère en possède) dont le titre décroît ensuite au cours du temps. En effet, les anticorps d'origine maternels (AOM) sont transférés à 90% via le colostrum (Burtonboy et al, 1991). Ce transfert d'immunité passive est primordial et doit être précoce car la barrière intestinale n'est principalement perméable aux immunoglobulines que pendant les 12 premières heures après la naissance (Chastant-Maillard et al, 2012). Les IgG sont majoritaires (60-75% des Ig) et les IgA représentent 16 à 40% des Ig colostrales mais deviennent ensuite majoritaires dans le lait (Chastant-Maillard et al, 2010). Ce sont les IgG qui sont l'élément clé de la protection immunitaire durant les premières semaines de vie puisqu'elles assurent l'immunité systémique. Les IgA, assurent quant à elles l'immunité locale digestive, et plus généralement des muqueuses. Les IgA apportées par le colostrum vont participer à la défense locale du tube digestif et ce rôle se poursuivra avec l'ingestion du lait, riche en IgA.

La protection contre le CPV-2 est étroitement associée à la présence d'anticorps neutralisants sériques puisque l'intestin est infecté par voie sanguine. Ainsi, les anticorps maternels absorbés via la prise colostrale durant les 24 premières heures après la naissance protègent les chiots contre l'infection par le parvovirus, en séquestrant le virus et en empêchant la virémie (Elia et al, 2005), jusqu'à ce qu'ils déclinent à de très faibles concentrations (Meunier et al, 1985a ; Pollock 1982a ; Mila et al, 2012a). Le titre en AOM

permettant d'assurer une protection suffisante pendant les premières semaines de vie varie beaucoup d'une étude à l'autre. On estime que des titres en anticorps (AC) > 1:80 - 1:160 seraient relativement protecteurs contre le CPV-2, ce qui correspondrait aux 2 à 5 premières semaines de vie suivant le transfert colostral (Pollock et Carmichael, 1982a). Néanmoins, il faut que le taux d'anticorps dépasse 1 :320 pour que le CPV-2 ne soit pas détecté dans les fèces (Elia et al, 2005). De plus, Mila et al (2014a) ont observé chez des chiots naturellement infectés dans un élevage avec des mères vaccinées qu'à J2, 43% des chiots avaient des titres $\leq 1:160$. La taille de la race et la croissance précoce des chiots étaient associés au taux d'anticorps les 48 premières heures : les chiots de grande race avaient des titres en AOM plus forts et les chiots ayant subi une perte de poids durant les 48 premières heures avaient des titres plus faibles. 95,7% des chiots ont développé une infection CPV-2, et ceux avec les titres faibles en AOM ont excrété le virus plus tôt, ce qui montre bien le lien entre le transfert d'immunité passive et la protection contre l'infection CPV-2. Ainsi, des différences de taux d'AOM entre les chiots pourraient expliquer pourquoi certains chiots expriment des formes cliniques sévères tandis que d'autres ne montrent pas ($AOM > 1:80$) ou peu de signes ($1:20 < AOM < 1:80$) (Decaro, 2016). Ils sont protégés de la maladie clinique mais pas de l'infection. Quelque que soit le titre de départ, le taux d'AOM décline au cours du temps. Chez le chien, la demi-vie des anticorps maternels contre le parvovirus est d'environ 10 jours (Parrish et al, 1982 ; Goddard et Leisewitz, 2010) avec une persistance à des niveaux protecteurs jusqu'à 8-15 semaines d'âge (Pollock et Coyne, 1993). Néanmoins, les titres en AOM déclinent plus rapidement lors d'un challenge viral, probablement du fait d'une séquestration des anticorps par le virus (Macartney et al, 1988). En élevage, lors de circulation virale, la diminution du taux d'AOM va donc être accélérée, les chiots étant exposés de façon répétée au virus.

L'immunité maternelle liée au CCV n'a en revanche pas été étudié à notre connaissance.

1.1.2. Immunité locale

Une protection complète n'est assurée que grâce à une combinaison avec l'immunité locale, conférée par les anticorps d'origine intestinale (copro-anticorps tel que les IgA, classe d'AC prédominante dans la protection muqueuse, ainsi que les IgG et IgM synthétisées par la *lamina propria* intestinale et transportées de manière non spécifique jusqu'à la lumière intestinale). En effet, plus la quantité d'AC excrétée dans les fèces est importante, plus la charge virale excrétée et l'expression clinique des chiots sont faibles, alors qu'aucune corrélation entre la quantité d'AC dans le sérum et l'excrétion ou l'expression clinique n'a été trouvée (Rice et al, 1982). Une autre étude a quantifié et qualifié cette immunité locale : ainsi, des chiens infectés par voie orale répondent par une production locale d'IgM et d'IgA dès 3 jours post-infection, accompagné d'IgG en moindre quantité à partir 4 jours post-infection (Figure 5 ; Nara et al, 1983). Quinze jours post-infection, la quantité d'immunoglobulines dans les fèces redevient proche de zéro.

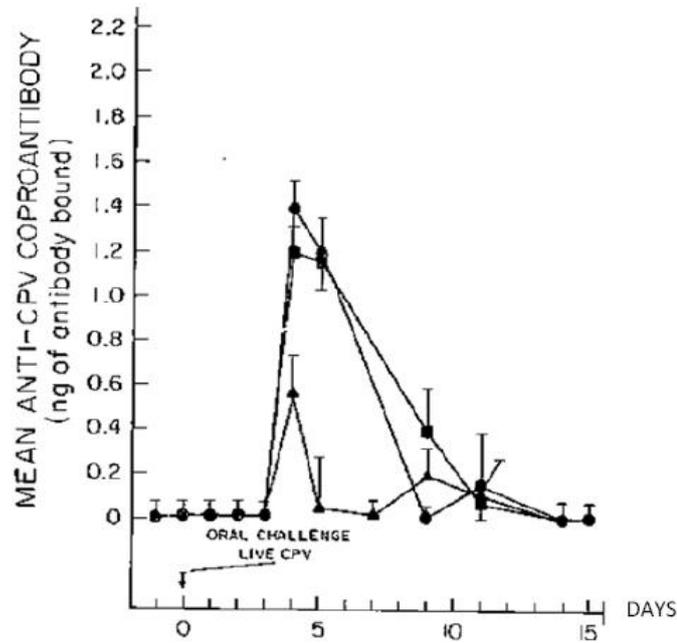


Figure 5 : Concentrations moyennes en anticorps anti-CPV-2 dans les fèces chez des chiens (N=3) après inoculation de CPV-2 vivant par voie orale (IgG ▲ IgM ● et IgA ■). D'après Nara et al (1983).

Certains chiens adultes peuvent également être infectés et ne montrer que peu ou pas de signes, en raison de la maturité supérieure de leur muqueuse intestinale (Decaro, 2016). Les infections subcliniques revêtent une importance particulière dans les élevages où la présence d'animaux porteurs sains pourrait favoriser la propagation du virus aux autres chiots (Broussou, 2015).

Lors de l'exposition au CCV, l'immunité locale joue un rôle dans la protection contre l'infection. Decaro et al (2004a) ont en effet montré qu'il existait une corrélation entre le taux d'IgA intestinal et le degré de protection contre le CCV, les IgA se complexant avec l'antigène et empêchant la fixation du virus aux cellules. Des IgG sont également retrouvées dans les sécrétions intestinales et atteignent leur concentration maximale vers le 14ème jour post-infection, ce qui correspond avec la disparition de l'excrétion du virus (Tennant et al, 1991) (Figure 6). Il semblerait néanmoins que ces AC ne protègent pas l'animal contre les réinfections.

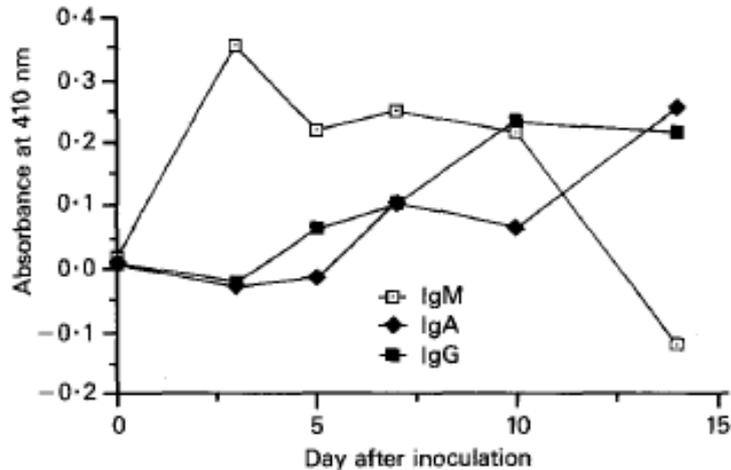


Figure 6 : Titres en IgM, IgG et IgA dans les sécrétions duodénales anti-CCV chez des chiens (N=5) infectés expérimentalement (souche CCV-C54) en fonction du temps. D'après Tennant et al 1991

1.2. Immunité : vaccination

Les chiens non vaccinés contre CPV-2 présentent clairement un risque élevé de développer la maladie par rapport à un animal bien vacciné (12,7 fois plus élevé d'après Houston et al (1996) mais la vaccination n'empêche cependant pas l'excrétion du parvovirus (Broussou, 2014).

La majorité des cas de parvovirose se développent chez des animaux entre 5 et 8 semaines d'âge, ce qui soulève l'intérêt de vacciner avant l'âge de 8 semaines (Grellet et al, 2014). Or, le principal problème de cette vaccination précoce est l'interférence des AOM avec l'immunisation active. La vaccination des chiots ayant des taux élevés d'AOM (>1:20 (Decaro, 2016) peut entraîner un défaut de séroconversion dû à la neutralisation du virus vaccinal par les AOM. Puisque seuls les titres >1:80 sont jugés protecteurs contre l'infection, il existe une période appelé le trou immunitaire ou fenêtre d'interférence pendant laquelle les chiots ne peuvent pas développer une réponse immunitaire efficace mais peuvent être infectés et développer la maladie. Cette fenêtre d'interférence dure de 40 à 69 jours de vie (Lida et al, 1990). Durant ces dernières années, des vaccins surtitrés en CPV-2 ont donc été développés pour être efficaces même pour des chiots avec des titres en AOM >1:80 (Buonavoglia et al, 1992).

Les vaccins utilisés le plus couramment sont des vaccins vivants atténués, préparés avec la souche CPV-2 originale, qui aujourd'hui ne circule plus sur le terrain. Des études ont montré que les anticorps produits en réponse au virus vaccinal ne neutralisent pas totalement les souches CPV sauvages actuelles (Decaro, 2016). En effet, Decaro et al (2008a) ont rapporté une infection par CPV-2c sur des chiens correctement vaccinés avec la souche originale. Il existe quelques vaccins contenant le variant CPV-2b, et il serait intéressant d'en formuler avec le variant 2c, qui induirait de meilleurs taux d'AC neutralisants, bien que les trois variants offrent une neutralisation croisée efficace (Cavalli et al, 2008 ; Glover et al, 2012). Un vaccin intra-nasal a également montré son efficacité (Martella et al, 2005a).

Concernant le coronavirus, il existe certains vaccins commercialisés en Amérique du Nord et dans certains pays d'Europe, contenant du virus vivant atténué ou inactivé. L'efficacité des vaccins inactivés est controversée. La plupart des vaccins utilise le sous-type IIa mais comme les réactions croisées entre les sous-types sont limitées, certains essaient de développer des vaccins avec le sous-type IIb (Decaro et al, 2011b). Après une exposition au CCV, l'excrétion virale serait importante, malgré la vaccination (Licitra et al, 2014).

Une étude d'innocuité et d'efficacité a été menée sur un vaccin CCV vivant atténué (Pratelli et al, 2004b). Ce vaccin n'aurait pas d'effet secondaire notable. Aucune excrétion virale dans les fèces n'a été observée chez les chiens vaccinés par voie intranasale. Decaro et al (2004a) ont également observé une quantité plus importante d'IgA dans les fèces lors d'une vaccination par voie intranasale que lors d'une vaccination intramusculaire. Les résultats obtenus lors de vaccination par voie intramusculaire sont, cependant, très satisfaisants. Ce vaccin n'est cependant pas disponible en France.

Aujourd'hui, les guidelines de Vaccination Guidelines Group (VGG) de la World Small Animal Veterinary Association ne recommande pas la vaccination systématique contre le CCV au vu de la faible prévalence de l'infection (Day et al, 2007) mais recommande une vaccination contre le parvovirus telle que la dernière injection de primo-vaccination soit faite entre 14 et 16 semaines d'âge, hors interférence des AOM, puis un premier rappel à l'âge d'un an, puis des rappels tous les trois ans. En effet, les données actuelles indiquent une protection contre le parvovirus canin supérieure à deux ans pour 93,7% des animaux ayant été correctement vaccinés (Goddard et Leisewitz, 2010). La durée de la protection post-vaccination contre le CCV n'a pas été étudiée.

1.3. Co-infections

Très peu d'études ont cherché à étudier une possible coopération entre le CCV et le CPV-2. Ntafis et al (2010) ont étudié une co-infection CCV-IIa/CCV-IIb et CPV-2 et ont montré que le CCV-IIb se propageait lors de co-infection avec le CPV-2 à des organes non habituellement colonisés lors d'infection simple. De plus, le coronavirus aggrave les signes cliniques lors de co-infection avec le CPV-2 (Appel, 1988) : ceci peut s'expliquer par leur pathogénie puisque le CPV et le CCV infectent l'épithélium intestinal respectivement au niveau des cryptes et des extrémités des villosités. La co-infection aggraverait donc probablement l'extension des lésions intestinales. D'autres viroses peuvent également être impliquées, puisque lors d'infections mixtes CCV/CPV-2 (Pratelli et al, 1999) ou CCV/adénovirus canin type 1 (Pratelli et al, 2001), le taux de mortalité augmente par rapport aux infections simples.

La présence de parasites intestinaux semble également favoriser l'infection et aggraver l'expression des signes cliniques (Grellet et al, 2014). Les chiots recevant un traitement vermifuge seraient moins sujet à développer des signes cliniques lors d'infection par le CPV-2 (Miranda et al, 2015). La présence de bactéries telles que les Salmonelles, les

Clostridies et les Campylobactéries dans la flore intestinale de l'animal pourrait jouer aussi un rôle dans la mise en place de l'infection mais toutes les études ne sont pas en accord, puisque certaines n'ont noté aucune différence dans la quantité ni le type de bactéries intestinales entre des chiens symptomatiques et asymptomatiques (Meunier et al, 1985a).

1.4. Age

La classe d'âge des animaux les plus fréquemment infectés par le parvovirus et le coronavirus est de 6-8 semaines (Grellet et al, 2014) mais d'après Miranda et al (2015), les chiots de 6 mois à 12 mois sont également à risque, même si l'infection chez les adultes non vaccinés reste possible. En effet, nous avons vu que le parvovirus cible les cellules à fort index mitotique. Or, pendant la période de sevrage, les entérocytes ont le plus haut indice mitotique à cause des changements de flore digestive, rendant les chiots plus sensibles à ce tropisme viral. Des facteurs de stress (parasitisme, conditions d'élevage...) peuvent de plus augmenter l'index mitotique des cellules et prédisposeraient les chiens à développer des signes cliniques plus ou moins marqués (Barker et Parrish, 2001 ; Goddard et al, 2010).

Néanmoins, les chiots infectés par le CPV-2 ont tendance à être plus jeunes que ceux infectés par le CCV, ce qui laisserait penser que les facteurs de risque pour les deux virus ne sont pas les mêmes (Godsall et al, 2010).

Cet effet « âge » doit donc également s'expliquer par l'évolution dans le temps des mécanismes immunitaires, avec la présence puis la décroissance des anticorps d'origine maternelle (AOM) et l'immunité locale. En effet, la gravité des signes cliniques est probablement déterminée par les dommages de l'intestin, eux-mêmes liés à l'immunité locale ou systémique. Si les chiots arrivent à se remettre de ces lésions, ils régénèrent leurs lignées lymphoïde et myéloïde ainsi que la population de leurs cellules entériques (Barker et Parrish, 2001).

1.5. Race, taille, génétique

Pour le CCV, aucune étude n'a étudié de prédisposition liée au sexe ou à la race. Concernant le parvovirus, certaines grandes races, comme le Berger Allemand, le Labrador, le Rottweiler, l'Alaskan Malamute et le Doberman, ont été décrites comme plus à risque de développer des signes cliniques lors d'infection (Houston et al, 1996). Cela pourrait être dû au fait que le taux d'AOM chute plus rapidement chez les chiots de grand format que chez les chiots de petit format (Mila et al, 2014a). Kalli et al (2010) ont réalisé une étude des facteurs prédisposant sur 94 chiots ayant contracté la parvovirose. Ils ont analysé les paramètres qui peuvent influencer la survenue de l'infection, la durée d'hospitalisation, et la survie. Leurs résultats indiquent que les chiens de race « pure » sont plus susceptibles de contracter une parvovirose que les chiens dits « croisés ». En revanche, Godsall et al (2010) n'ont montré aucune corrélation entre la taille de la race ou la présence d'un pedigree et les signes cliniques de la parvovirose.

1.6. Sexe

Avant l'âge de 6 mois, aucune prédisposition du sexe n'a été établie (Houston et al, 1996). Parmi les animaux de plus de 6 mois, les mâles entiers apparaissent deux fois plus sensibles à l'infection par le parvovirus que les femelles non stérilisées, et ils présentent un risque quatre fois plus important de développer la maladie que des mâles castrés du même âge (Houston et al, 1996). Ceci peut s'expliquer par la tendance au vagabondage de ces chiens (Goddard et Leisewitz, 2010).

2. Facteurs liés à l'agent pathogène

Le coronavirus étant un virus dont les capacités de mutation sont importantes, d'autres souches ont été isolées par Decaro et al (2010), certaines proches du virus TGEV (Transmissible GastroEnteritis coronaVirus) du porc, et ont amené les auteurs à classer le CCV-II en deux sous-types CCV-IIa (CCV classique) et CCV-IIb (entérite plus sévère). Il a alors été noté que CCV-IIb se propageait en Europe, avec une prévalence importante dans les pays de l'Europe de l'Est (Decaro et al, 2010).

De plus, des études ont décrit l'émergence de nouveaux biotypes CCV hypervirulents, associés à des troubles entéritiques plus sévères qu'avec les souches classiques, pouvant entraîner la mort de l'animal atteint (Evermann et al, 2005). En Italie, Buonavoglia et al (2006) ont décrit pour la première fois une infection pantropique avec une infection systémique fatale chez des chiots. Les chiots étaient en hyperthermie à 39,5-40°C, léthargiques. Ils présentaient une perte d'appétit, des vomissements, une diarrhée hémorragique, une leucopénie sévère et des signes neurologiques (ataxie, convulsions). Les animaux sont décédés rapidement, environ deux jours après le début des symptômes. Zicola et al (2012) ont également rapporté des cas de CCV pantropique en France et en Belgique. Ce variant a été identifié comme une souche du CCV type II, la souche CB/05. Une étude décrivant une infection expérimentale par la souche CB/05 (Decaro et al, 2008b) a confirmé l'infection généralisée provoquée par cette souche puisque l'ARN viral a été détecté par PCR dans le sang et différents organes d'un des chiens, ce qui démontrait l'évolution du coronavirus à s'étendre du tube digestif vers d'autres organes.

3. Facteurs liés à l'environnement

Un environnement stressant semble également favorable à l'expression d'une parvovirose clinique (Goddard et Leisewitz, 2010). Les chiens qui vivent en collectivité (chenil ou élevage accueillant plus de 30 chiens) ou qui se rendent dans des lieux avec une densité de population canine élevée présentent un risque supérieur d'être infecté (Grellet et al, 2014). La forte contagiosité de la maladie et la proximité des chiens en sont les principales causes.

La saisonnalité de ces virus est très controversée : d'après Houston et al (1996), les chiens semblent présenter trois fois plus de chance de contracter une infection par le parvovirus en juillet, août, septembre que les autres mois de l'année et l'infection par le CCV serait plus fréquente en hiver, mais Kalli et al (2010) n'ont montré aucune différence entre les saisons chaudes et froides.

Le parvovirus et le coronavirus canin sont donc impliqués dans les troubles digestifs du chiot mais une grande variabilité des signes cliniques est observée. De par leur physiopathogénie et leurs facteurs de risque, ils n'infectent pas les chiots de la même manière. Peu d'études se sont intéressées au suivi de ces deux agents présents simultanément en élevage et à la répercussion clinique de la co-infection sur les chiots. C'est pourquoi nous avons étudié dans notre étude une co-infection naturelle de ces deux agents pathogènes chez des chiots dans un élevage canin. Ainsi, les objectifs de cette étude furent de mieux comprendre les cinétiques d'excrétion du CPV-2 et du CCV, d'étudier les répercussions cliniques de ces deux virus afin d'essayer de déterminer un seuil de pathogénicité, de déterminer quels sont les animaux les plus à risque et donc à cibler dans le protocole de prévention de l'élevage.

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Matériels et méthodes

1. Zootecnie de l'élevage étudié

1.1. Structure et gestion des animaux à la reproduction

Cette étude a été menée dans un élevage canin du Nord de la France, structure multi- raciale comptant environ 300 mères. Les chiennes en chaleurs ou en début de gestation étaient hébergées dans un bâtiment dédié dans des enclos paillés, par groupes de 2 à 6 individus selon la taille de la race. Une fois par semaine, les éleveurs faisaient entrer en maternité toutes les chiennes qui devaient mettre bas au plus tard dans les 14 jours suivants. La maternité était un bâtiment composé d'un couloir central donnant sur 8 salles, 4 de chaque côté du couloir (Figure 7). Chaque salle était constituée de six cases individuelles de mise-bas. Chaque case avait le chauffage au sol et une lampe chauffante pour les plus jeunes chiots. Le sol était bétonné et recouvert de copeaux. Les chiennes restaient dans ces salles de mise-bas avec leurs chiots jusqu'au sevrage des chiots (6 à 8 semaines après la mise-bas) puis repartaient dans les enclos paillés.

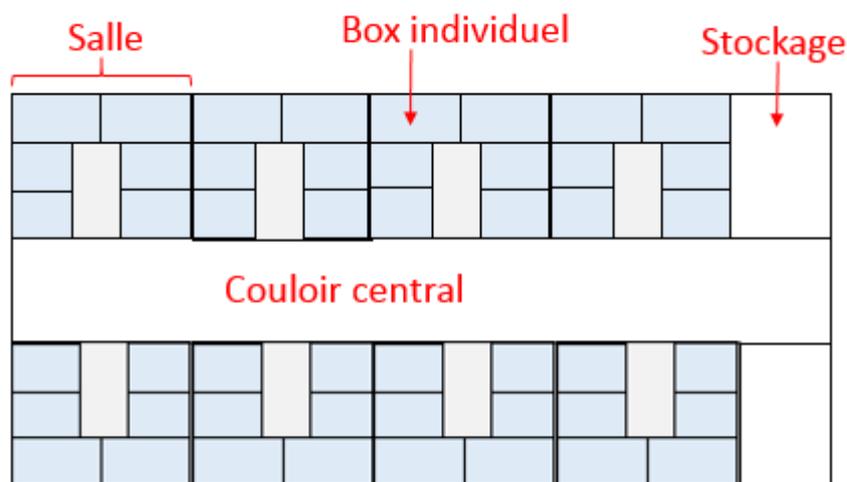


Figure 7 : Schéma de la structure du bâtiment de maternité de l'élevage

Les chiots d'une même portée restaient 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 n'étaient en contact qu'avec les chiots de leur portée, leur mère et les soigneurs. Une fois sevrés, ils migraient dans un autre bâtiment de l'autre côté de l'élevage, la nurserie.

1.2. Protocole de prophylaxie sanitaire

Un nettoyage quotidien à l'aide d'un détergent industriel suivi d'une désinfection à l'eau de Javel était effectué dans toutes les pièces et couloirs de la maternité. Les cases

étaient nettoyées et désinfectées tous les matins. Pendant le nettoyage, les chiots étaient mis dans un bac en plastique juste devant la case. Les selles et les copeaux souillés étaient retirés, le sol nettoyé avec un détergent, désinfecté avec de l'eau javellisée, puis rincé. Une fois le sol sec, les chiots étaient remis dans la case.

Entre deux cycles de mise-bas dans une salle, une procédure précise de nettoyage-désinfection de la salle était réalisée, suivie d'un vide sanitaire. Un premier rinçage au jet d'eau permettait d'enlever tous les résidus visibles (fèces, copeaux, poils). Un dégraissage de toutes les surfaces était réalisé avec un détergent (Calciclean®, Calcialiment, Crepy) en utilisant un canon à mousse. Un rinçage était effectué à l'eau chaude sous haute pression (200 bars). Ensuite, la salle était 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 était effectué à l'eau chaude sous haute pression et la salle était fermée à clef jusqu'à l'entrée des nouvelles chiennes. Le vide sanitaire dans la salle dépendait du nombre de chiennes qui devaient entrer en maternité (2 jours à 14 jours).

1.3. Protocole de prophylaxie médicale

Toutes les chiennes de l'élevage étaient vaccinées une fois par an au mois de mars avec un vaccin CHPPi+L (Eurican®, Merial, France), dirigé contre la maladie de Carré (C), l'hépatite de Rubarth (H), la parvovirose (P), le parainfluenza (Pi) et la leptospirose (L). Au moment de l'étude, toutes les chiennes étaient à jour de leur vaccination.

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

2. Chiots inclus dans l'étude

Au total, 145 chiots issus de 31 portées nés entre le 15 août 2013 au 30 novembre 2013 ont été inclus dans l'étude.

Les chiots ont été suivis de la naissance à 56 jours et ont été séparés par format racial en petite et grande races. Une race est considérée comme petite (Small) pour un poids adulte inférieur à 10kg et les grandes races (Large) un poids supérieur à 25kg (aucun chiot de race moyenne n'a été inclus dans notre étude). Tous les chiots avaient accès au lait de leur mère et à une alimentation *ad libitum* à base de croquettes (Starter, Royal Canin, Aimargues).

3. Données cliniques

3.1. Collecte des données cliniques

Les chiots étaient identifiés à la naissance à l'aide de colliers de laine de différentes couleurs, qui étaient renouvelés chaque semaine, et ce pour chaque portée. Ainsi, à chaque chiot correspondaient un numéro de portée, par ordre chronologique de naissance, ainsi

qu'une couleur associée à une lettre de l'alphabet choisie aléatoirement (exemple : collier Bleu = A). Cette identification a permis d'effectuer une récolte d'un ensemble de données cliniques individuelles des chiots de la naissance jusqu'à J56.

Certaines données cliniques (température rectale...) ont été récoltées quotidiennement et sont référencées par le jour de collecte (J...) et d'autres ont été collectées de façon hebdomadaire et sont référencées par la semaine de collecte (S...) : poids, examen clinique, présence de diarrhée, hospitalisation. Les pesées s'effectuaient à l'aide d'une balance électronique précise à 0,1g. Les chiots étaient pesés à la naissance puis une fois par semaine jusqu'à J56.

La semaine S1 correspondait aux jours J0 à J6, jusqu'à la semaine S8 correspondant aux jours J49 à J55 (Figure 8).

LITTER NR:	BITCH ID:		BREED:				PARTURITION: <small>(date, hour)</small>				
PUPPY ID:	color:	F <input type="checkbox"/>	M <input type="checkbox"/>	Q1 <input type="checkbox"/>	Q2 <input type="checkbox"/>	Q3 <input type="checkbox"/>	Q4 <input type="checkbox"/>	L <input type="checkbox"/>	0 <input type="checkbox"/>	Died:	
	D21	D28	D35	D42	D49	D56					
Weight											
Suppl. Dose											
Rectal Temperature											
Hydratation											
Mucosa color											
HR											
RR											
Irritability/ Chest auscult											
Motility/ abdomen palp											
Eye discharge											
Nasal Discharge											
Diarrhea											

Figure 8 : Exemple d'une fiche de suivi utilisée lors de l'étude (HR=Heart Rate, RR=Respiratory Rate, D21=J21)

3.2. Traitement des données cliniques

3.2.1. Signes de morbidité et score de morbidité

Trois paramètres anormaux de l'examen clinique ont été considérés comme des signes de morbidité : une hyperthermie >39°C, une diarrhée et/ou une perte de poids (gain moyen hebdomadaire (GMH) négatif, entre la pesée d'une semaine et celle de la suivante).

Ces signes étaient scorés de façon binaire 0 en cas d'absence ou 1 en présence du signe, permettant le calcul d'un score clinique hebdomadaire sur 3. Si au moins 1 signe de morbidité (un score supérieur ou égal à 1/3) était observé, l'animal était considéré comme « morbide ».

3.2.2. Hospitalisation

Si l'état clinique de l'animal devenait critique, il était hospitalisé de façon à mettre en place un traitement symptomatique adapté à chaque chiot (perfusion intra-veineuse...). Cet événement était également reporté sur les fiches cliniques.

4. Prélèvements et PCR

4.1. Prélèvements

Des 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.

Les prélèvements rectaux ont été réalisés une fois par semaine à partir de J28 (J28, J35, J42, J49 et J56) pour chaque chiot (soit 145x5=745 écouvillons) (Figure 9).

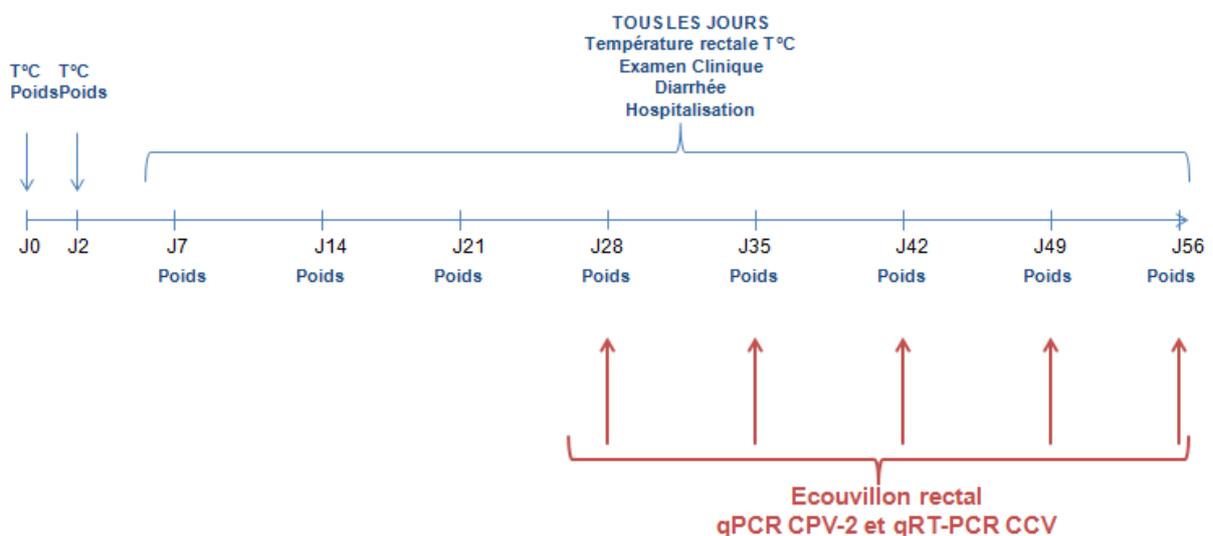


Figure 9 : Protocole du suivi clinique et de prélèvements des chiots de J0 à J56

4.2. Excrétion virale

Les charges virales excrétées dans les fèces ont été quantifiées par PCR en temps réel pour le CPV-2 et RT-PCR pour le CCV par le laboratoire Scanelis (Colomiers) (par la suite, l'ensemble des analyses seront désignés par l'appellation « PCR »). Les écouvillons ont été traités de la façon suivante :

- Préparation des échantillons : les écouvillons sont rincés dans 1 mL d'eau nucléase-free par agitation forte pendant 5 minutes
- Prise d'essai de 200µl (soit 1/5 de l'écouvillon) pour la purification des acides nucléiques (colonnes de silice, Macherey Nagel – Protocole propriété Scanelis) puis élution des acides nucléiques dans un volume de 200µl.
- Contrôle de la qualité de l'extraction des acides nucléiques et recherche des inhibiteurs de PCR par PCR en temps réel
- Prise d'essai pour la PCR : 2,5 µl d'acides nucléiques extraits (correspondant à 1/80 du prélèvement extrait).

Le résultat quantitatif fut enfin normalisé par écouvillon (multiplication par $80 \times 5 = 400$). Les résultats nous ont été transférés sur un fichier Excel 2007®, chaque résultat étant nommé par jour de prise (J28, J35, J42, J49, J56) et par l'identification du chiot (N° de portée et Lettre). Ils étaient exprimés en copies équivalent génome par écouvillon (noté pour la suite « copies/écouvillon »).

Pour toute PCR, l'excrétion ne peut être mise en évidence qu'au-dessus d'un seuil de détection. Les prélèvements négatifs correspondent donc à des valeurs d'excrétion nulles ou inférieures au seuil de détection. Ainsi les prélèvements furent considérés comme positifs dès lors qu'ils furent au dessus du seuil de détection. Le seuil de détection et la gamme de quantification varient suivant le virus (Figure 10).

4.3. Seuils de la méthode PCR CPV-2

Les seuils utilisés pour la PCR CPV-2 sont les suivants :

- Seuil de détection 95% (SD 95%) : 4 copies de séquence cible pour 2,5 µl d'acides nucléiques extraits (déterminé selon les recommandations de la Pharmacopée Européenne pour les tests moléculaires), soit SD 95% CPV-2 : $4 \times 400 = 1600$ copies équivalent génome
- Seuil de quantification (SQ) : 10 copies de séquence cible pour 2,5µl d'acides nucléiques extraits, soit SQ CPV-2 : $10 \times 400 = 4000$ copies équivalent génome.

La gamme de quantification va de 10 à 10^7 copies pour 2,5 µl soit 4000 à $4 \cdot 10^9$ copies équivalent génome par écouvillon (cf Figure 10).

4.4. Seuils de la méthode RT-PCR CCV

Les seuils utilisés pour la RT-PCR CCV sont les suivants :

- Seuil de détection 95% (SD 95%) : 37 copies de séquence cible pour 2,5 µl d'acides nucléiques extraits (déterminé selon les recommandations de la Pharmacopée Européenne pour les tests moléculaires), soit SD 95% CCV : $37 \times 400 = 14800$ copies équivalent génome

- Seuil de quantification (SQ) : 100 copies de séquence cible pour 2,5µl d'acides nucléiques extraits, soit SQ CCV : $100 \times 400 = 40000$ copies équivalent génome.

La gamme de quantification va de 10^2 à 10^7 copies pour 2,5 µl soit 40000 à 4.10^9 copies équivalent génome par écouvillon (Figure 10).

4.5. Traitements des données PCR

Les prélèvements négatifs ont été noté 0. Lorsque l'excrétion était positive mais inférieure au seuil de quantification, nous avons choisi arbitrairement d'associer une valeur inférieure au seuil : 3900 copies/écouvillon pour le CPV-2 (le seuil étant fixé à 4000 copies/écouvillon) et 39000 copies/écouvillon pour le CCV (le seuil étant fixé à 40000 copies/écouvillon). Pour les prélèvements supérieurs au seuil maximal de quantification, nous avons de même choisi d'associer la valeur $4.1.10^9$ copies/écouvillon (le seuil étant fixé à 4.10^9 copies/écouvillon pour les deux virus). Un chiot fut considéré comme excréteur (noté Ex) s'il excrétrait une quantité virale supérieure au seuil de quantification, et non excréteur (noté NEx) si la quantité excrétée était non quantifiable (Figure 10).

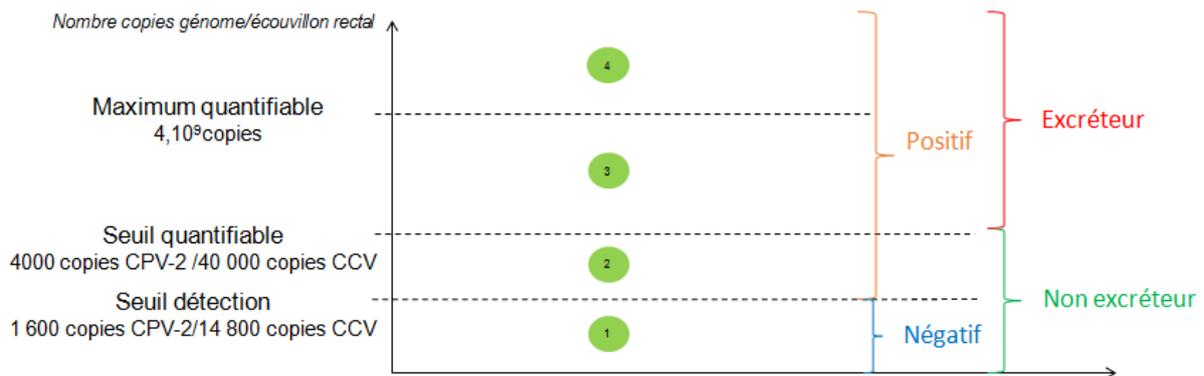


Figure 10 : Seuils utilisés pour le PCR CPV-2 et la RT-PCR CCV

(1= Négatif, sous seuil de détection, 2=Positif, Seuil détectable-Seuil quantifiable, 3= Positif, Seuil quantifiable-Maximum quantifiable, 4=Positif >Maximum quantifiable)

Pour l'analyse, le niveau d'excrétion a été exprimé soit en valeur quantitative, soit en gamme de puissance de « 10^x » (c'est-à-dire que par exemple toutes les charges qui en valeurs quantitatives furent $\geq 1 \times 10^3$ et $< 1 \times 10^4$ furent noté 3).

Afin d'étudier la cinétique d'excrétion virale de chacun des virus, nous nous sommes intéressés à plusieurs points (Figure 11) :

- La date de la première PCR supérieure au seuil de quantification (début d'excrétion)
- La date et la valeur de la charge maximale (pic d'excrétion)
- La charge globale excrétée au cours du temps, déterminée via l'aire sous la courbe (AUC).

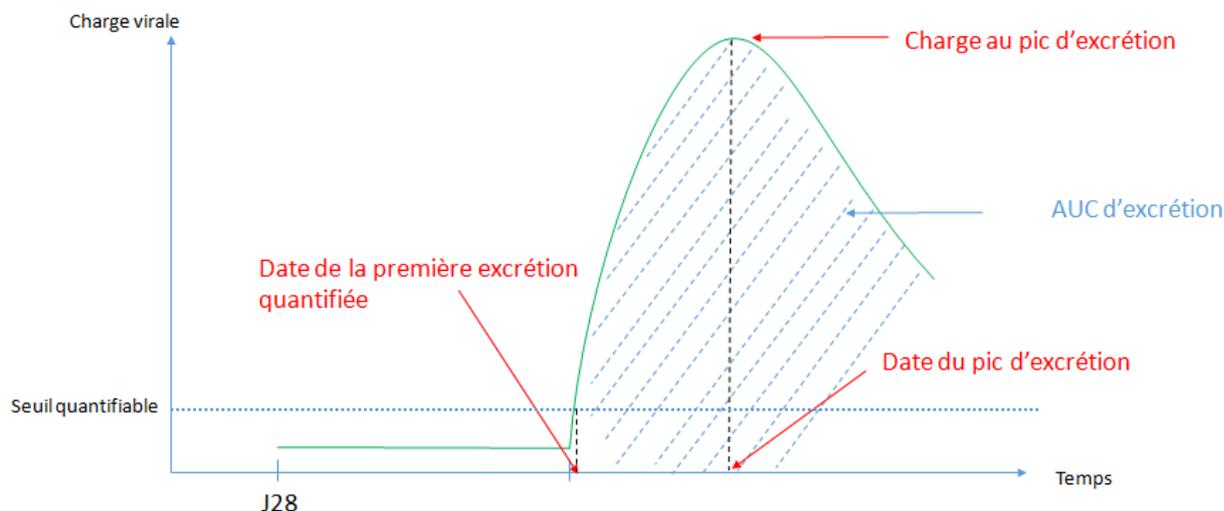


Figure 11 : Schéma théorique d'une excrétion virale avec les points d'intérêt de notre étude

Chaque résultat PCR de J28 à J49 correspond respectivement au jour de début des semaines S4 à S8 et J56 correspond au dernier jour de l'étude. Pour l'étude des signes cliniques, nous nous sommes intéressés pour chaque jour de PCR à la présence de chacun des signes la semaine précédant la PCR, nommée « semaine avant », et la semaine suivant la PCR, nommée « semaine après » (Figure 12). Ainsi par exemple, la semaine S4 est la « semaine avant » de la PCR J28 et la semaine S5 est sa « semaine après ».

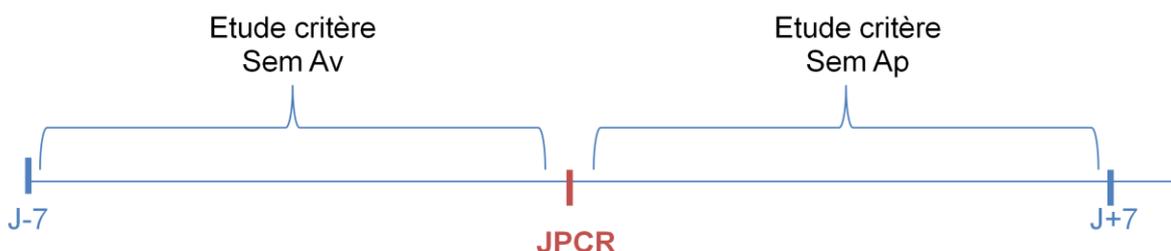


Figure 12 : Représentation des semaines d'avant (Sem Av) et d'après (Sem Ap) par rapport au jour de PCR.

5. Analyses statistiques

Les données récoltées ont servi à construire un tableau sous Excel 2007®.

Les résultats sont présentés sous la forme de proportion (en %) ou de moyenne \pm écart-type.

La fonction « lmer » du logiciel R® (R Foundation for Statistical Computing, Université d'Auckland, Nouvelle Zélande) nous a permis de réaliser des analyses multivariées prenant en compte différents effets comme la période (J28, J35, J42, J49, J56 ou après regroupement en 2 périodes J28-42 vs J49-46 suivant les cas), le format racial (Large vs Small), la taille de la

portée (inférieure vs supérieure à la médiane pour chaque format racial), le poids à 21j (inférieure vs supérieure à la médiane pour chaque format racial) et l'interaction de ces paramètres sur les charges virales excrétées et les paramètres de morbidité. L'effet portée fut pris comme « random term » dans chaque analyse multivariée (prise en compte de la plus grande similitude de deux chiots d'une même portée par rapport à deux chiots de portées différentes). Deux valeurs furent considérées comme significativement différentes lorsque $p < 0,05$.

Afin de déterminer le seuil d'excrétion pathologique en parvovirus et/ou en coronavirus, nous avons utilisé des courbes Receiver Operating Characteristic (ROC) (variables étudiées : charges excrétées en CPV-2 et CCV et variable binaire morbide ou non). Pour faire ceci, nous avons utilisé la fonction Courbe ROC du package XLStat dans le logiciel Excel 2007®. Ces courbes nous permettent de déterminer un seuil d'excrétion pour le meilleur couple sensibilité et spécificité.

II. Résultats

1. Description de la population étudiée

Sur les 31 portées incluses dans l'étude, les 145 chiots appartenaient aux 6 races suivantes : Bichon Frisé, Bichon Maltais, Golden Retriever, Labrador Retriever, Lhasa Apso, Shih Tzu (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des effectifs en fonction de la race.

Race	Effectif des mères	Effectif des chiots
Bichon Frisé	2	10
Bichon Maltais	5	19
Golden Retriever	11	64
Labrador Retriever	3	13
Lhasa Apso	7	27
Shih Tzu	3	12
TOTAL	31	145

La taille des portées a varié de 2 à 9 chiots. Il y a eu 14 portées (77 chiots) de grande race et 17 portées (68 chiots) de petite race. Le sex-ratio était de 66 femelles et 75 mâles. Quatre chiots de l'étude n'ont pas eu de sexe de reporté sur leur fiche clinique.

2. Etude de l'excrétion virale

2.1. Description des résultats PCR

Sur les 725 PCR CPV-2 (toutes périodes confondues), 61 (soit 8%) furent négatives, et les autres montrèrent une excrétion comprise entre 10^3 et 10^9 copies/écouvillon, avec une majorité (38%) à 10^3 copies/écouvillon (Figure 13).

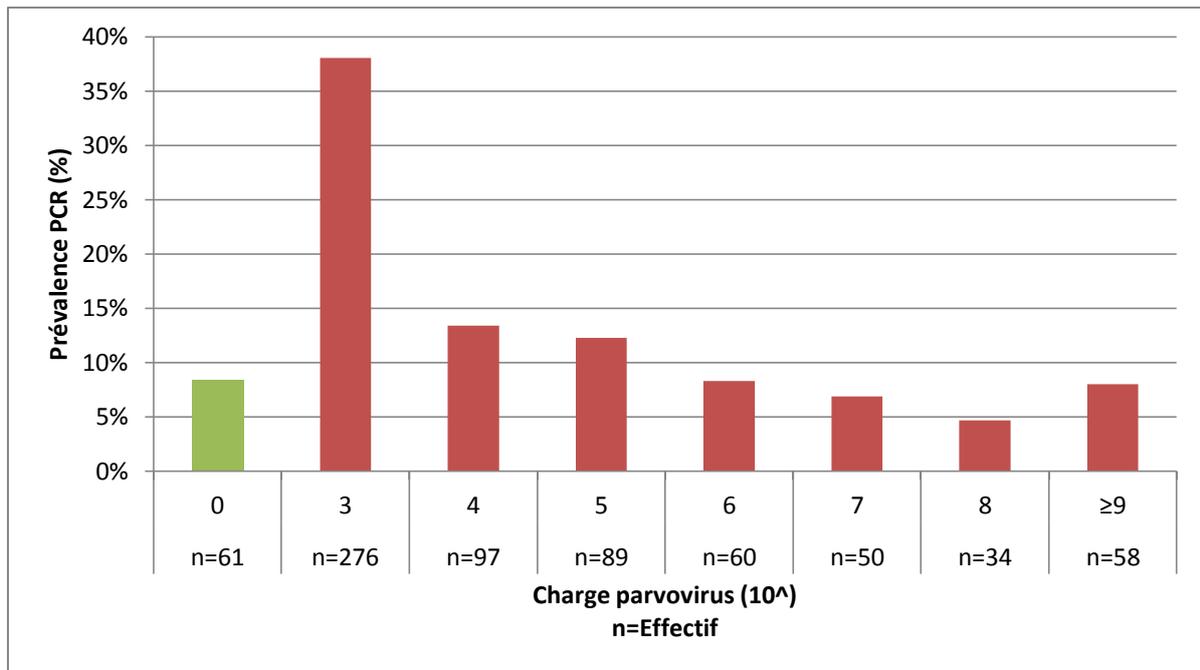


Figure 13 : Distribution des charges virales en CPV-2 (10^x) tous âges confondus (J28-J56), n=725 prélèvements.

Sur les 725 PCR CCV, 133 (soit 18%) furent négatives, et les autres montrèrent une excrétion comprise entre 10⁴ et 10⁹ copies/écouvillon, avec la majorité (45%) étant égale ou supérieure au maximum quantifiable (10⁹ copies/écouvillon (Figure 14). On a donc une forte dominante de charges excrétées en CCV élevées dans cet élevage.

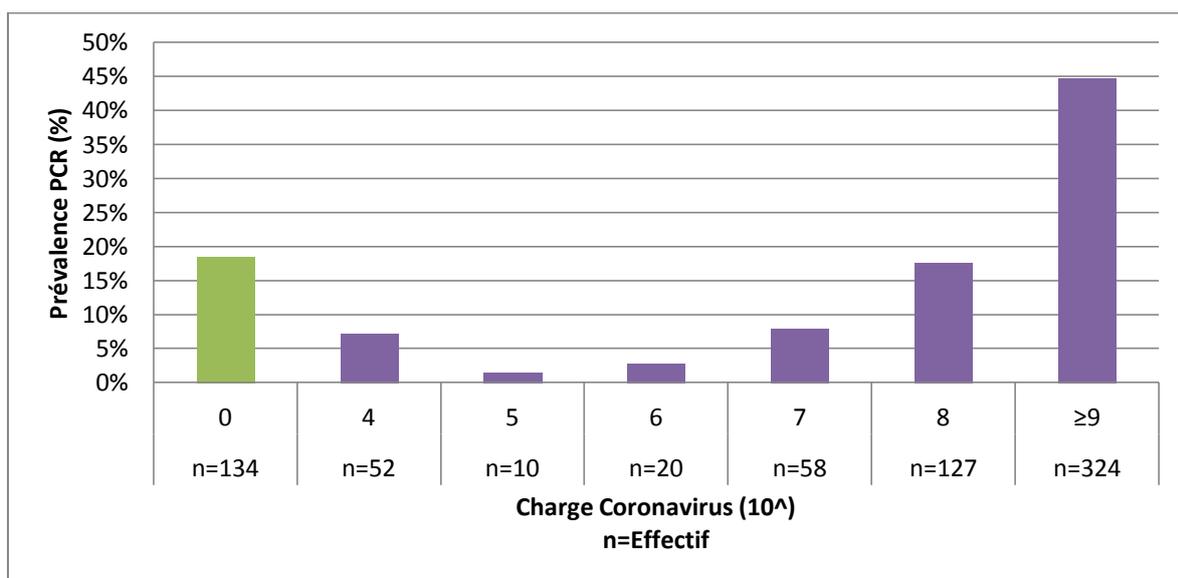


Figure 14 : Distribution des charges virales en CCV (10^x) tous âges confondus (J28-J56), n=725 prélèvements.

Le tableau 2 montre la répartition des différentes charges virales mesurées par rapport aux gammes de quantification. Tous les chiots furent au moins une fois excréteurs (≥SQ) en CPV-2 et en CCV sur la période d'étude.

Tableau 2 : Répartition des résultats PCR CPV-2 et CCV par rapport aux gammes de quantification.

	CPV2 (n=725)		CCV (n=725)	
(1) PCR inférieure au seuil de détection	8,4 % (n=61)	38,5 % (n=279)	18,3 % (n=133)	25,4 % (n=185)
(2) PCR entre le seuil de détection et le seuil de quantification	30,1 % (n=218)		7,1 % (n=52)	
(3) PCR entre le seuil quantifiable et le seuil maximal de quantification	56 % (n=406)		47,7 % (n=346)	
(4) PCR supérieure au seuil maximal de quantification	5,5 % (n=40)		26,8 % (n=194)	

2.2. Début d'excrétion

La Figure 15 présente la distribution du jour de début d'excrétion (\geq SQ). Le début d'excrétion du parvovirus apparaît dans des proportions similaires au cours des 4 premières semaines. La moitié des chiots (48%) furent excréteurs avant J42. Le nombre de chiots commençant à excréter du coronavirus à J28 fut plus faible que pour le parvovirus. La majorité (80%) des chiots commencèrent à excréter le coronavirus durant les semaines S5 et S6. Ainsi, 64% des chiots furent excréteurs avant J42 et quasiment tous les chiots (97%) furent excréteurs avant J49.

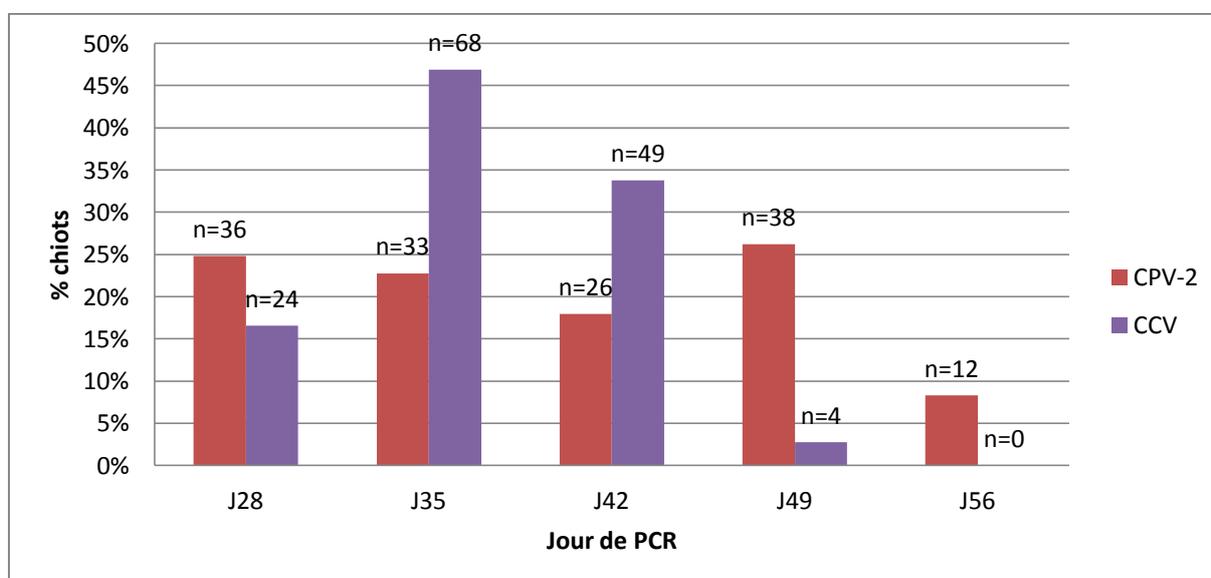


Figure 15 : Proportion de chiots excréteurs pour la première fois en CPV-2 et CCV au cours du temps (Jour de PCR), n=725 prélèvements.

Le poids à 21j et la taille de portée n'avaient pas d'influence sur le début de l'excrétion des deux virus. Les chiots de grande race avaient en revanche tendance ($p=0,066$) à excréter plus précocement le CPV-2 que les chiots de petites races (Figure 16), avec une avance de l'ordre de 15 jours.

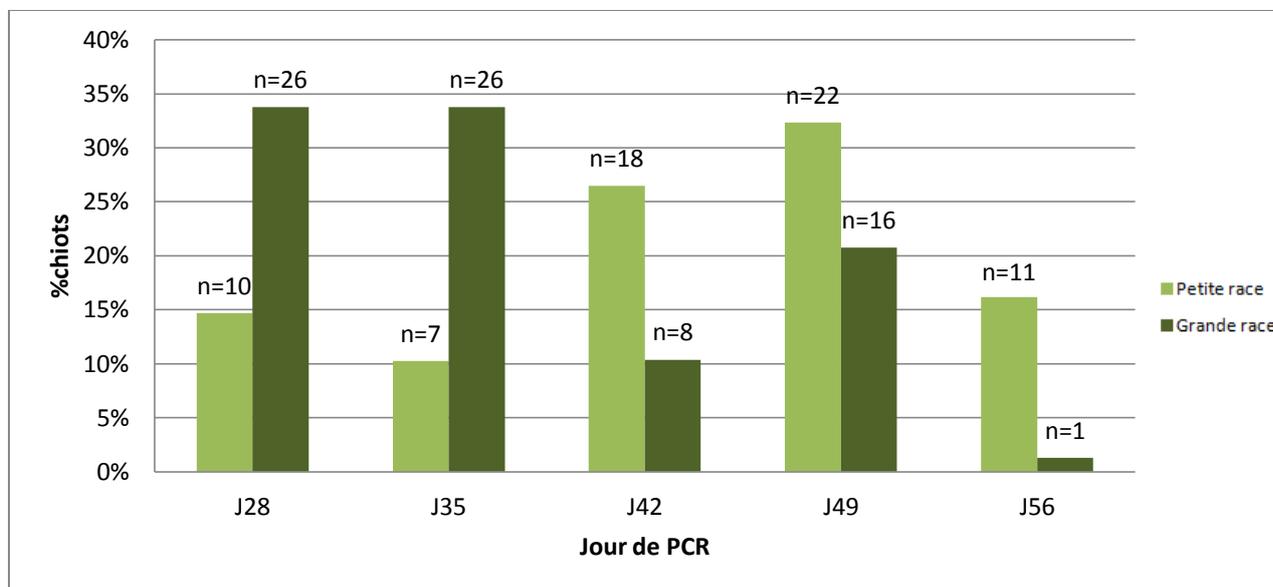


Figure 16 : Distribution du début d'excrétion virale en CPV-2 en fonction du format racial, n=725 prélèvements.

2.3. Pic d'excrétion

Le pic d'excrétion fut défini comme la charge maximale détectée entre J28 et J56. Nous nous sommes intéressés à deux paramètres : la période d'apparition de ce pic et la charge excrétée par les chiots au pic. Concernant le moment du pic d'excrétion en parvovirus, un effet de l'âge fut observé. En effet, la proportion de chiots atteignant leur pic d'excrétion augmenta avec le temps. Ainsi, 3% des chiots eurent leur pic d'excrétion à J28 contre 34% à J56 (Figure 17). Le pic d'excrétion en coronavirus fut en revanche atteint plus précocement, puisque 55% des chiots l'atteignirent avant J49 avec la plus forte prévalence à J42 (Figure 17).

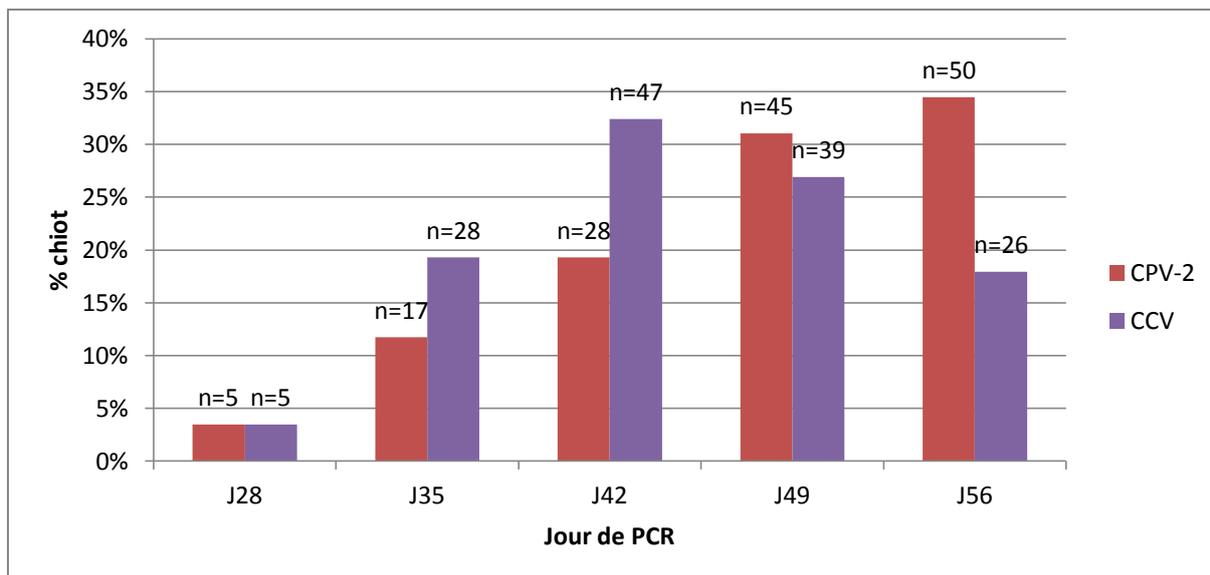


Figure 17 : Distribution du pic d'excrétion en CPV-2 et CCV au cours du temps (jour de PCR), n=725 prélèvements.

Le poids à 21j et la taille de la portée n'avaient pas d'effet sur la période d'apparition du pic d'excrétion. En revanche, un effet de la taille de la race fut observé pour le parvovirus. Les chiots de grande race tendaient ($p=0,072$) à exprimer un pic d'excrétion plus précocement que les chiots de petites races, avec une avance de l'ordre d'une semaine. La plus forte prévalence des pics d'excrétion fut observée à J49 pour les grandes races (40%) et à J56 pour les petites races (57%) (Figure 18).

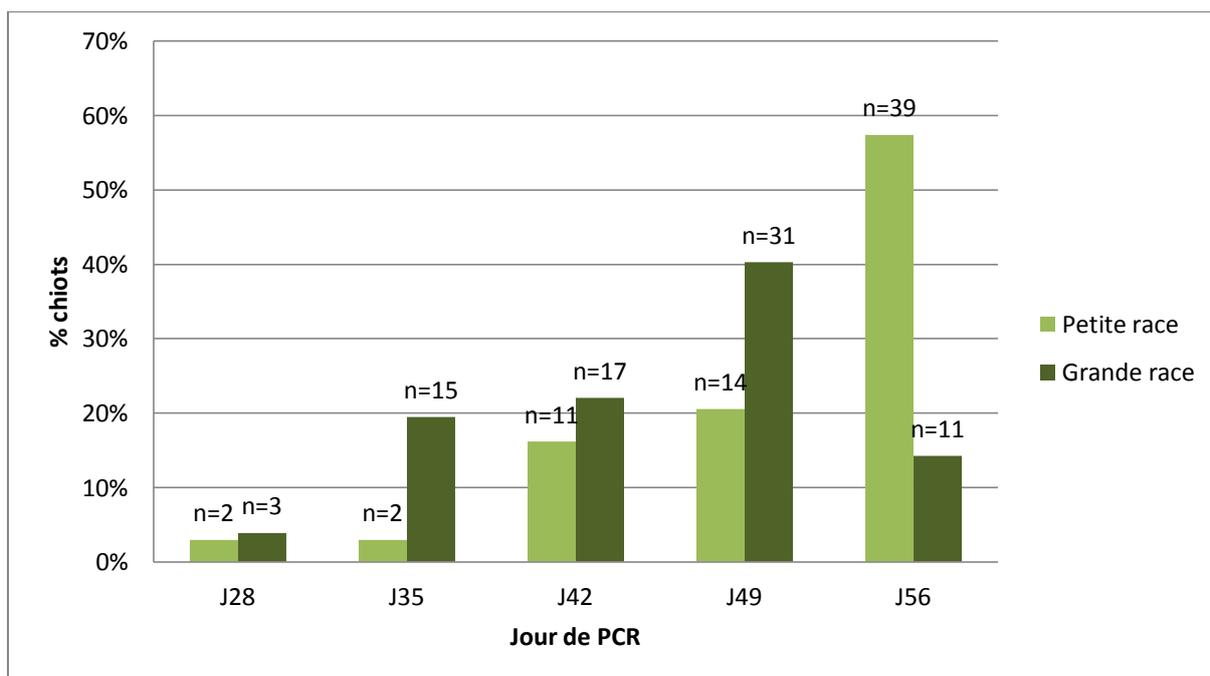


Figure 18 : Distribution du pic d'excrétion en CPV-2 au cours du temps en fonction du format racial, n=725 prélèvements.

La valeur de la charge virale excrétée au pic n'était pas significativement différente suivant la période d'apparition du pic (charge moyenne excrétée au pic pour le CPV-2 de 10^8 et de 10^9 pour le CCV). De même, ni le poids à 21j, ni la taille de portée, ni le format racial n'avaient d'effet significatif sur la valeur du pic d'excrétion du parvovirus ou du coronavirus.

2.4. Charge globale excrétée au cours du temps (AUC)

Concernant le parvovirus, aucun effet (poids à 21j, taille de la portée, format racial) n'a été observé sur la charge excrétée en CPV-2 sur toute la période d'étude. En revanche, le format racial a eu un effet significatif ($p=0,01$) sur la charge globale excrétée en coronavirus. Ainsi, les chiots de grande race « Large » excrétèrent une charge plus importante en coronavirus que les chiots de petite race « Small » (Figure 19).

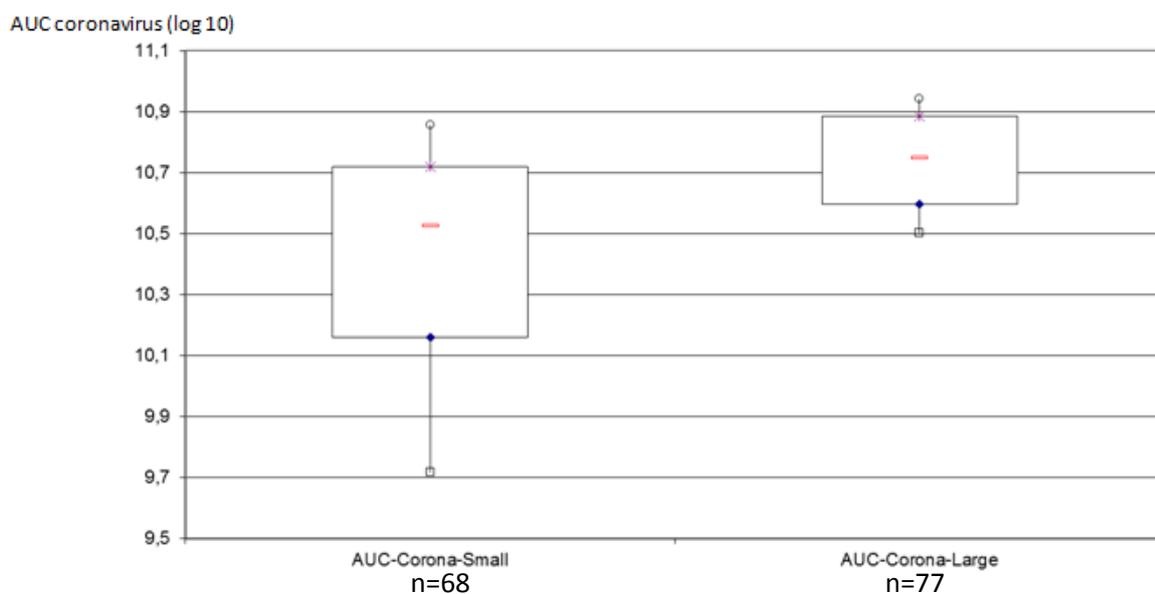


Figure 19 : Charge globale en coronavirus excrétée en fonction du format racial = AUC moyenne (log 10) \pm écart-type, n=725 prélèvements.

2.5. Profil d'excrétion au cours du temps

La période fut le facteur de variation ayant l'effet le plus significatif sur la charge excrétée en parvovirus et en coronavirus ($p < 0.001$). Ainsi, nous avons pu noter que les charges excrétées en parvovirus et en coronavirus étaient de plus en plus importantes au cours du temps (Figure 20).

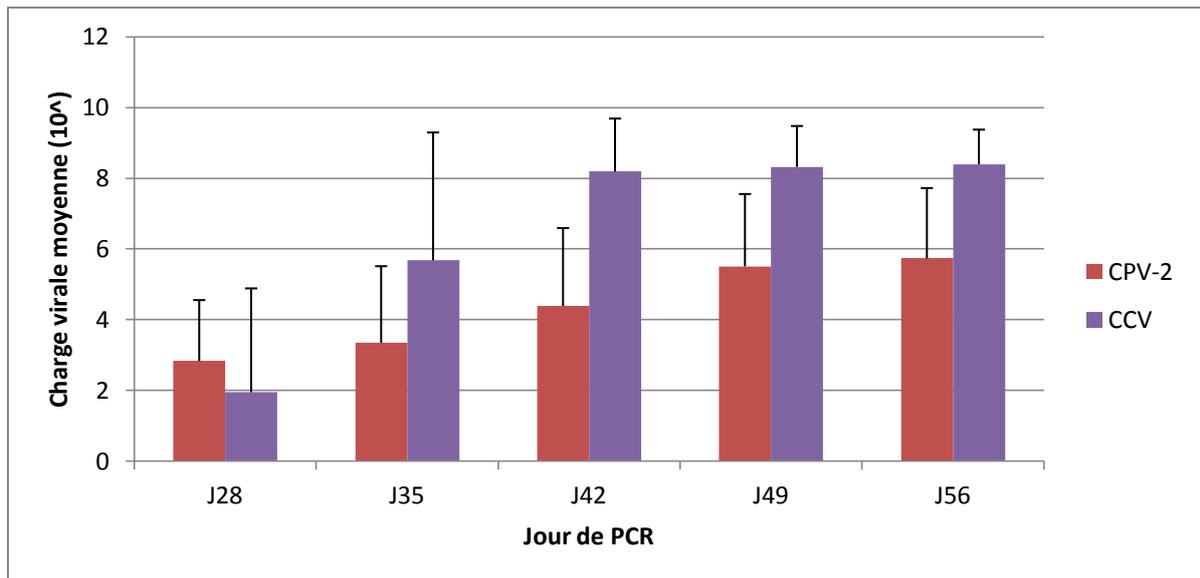


Figure 20 : Charge moyenne (10⁴) excrétée en CPV-2 et en CCV au cours du temps (moyenne ±écart-type, n=725 prélèvements).

Tous les chiots de l'élevage ont suivi en globalité la même cinétique d'excrétion pour un virus donné. La Figure 21 illustre pour 10 chiots pris au hasard dans l'élevage l'évolution de la charge excrétée en CPV-2 au cours du temps. On remarque ainsi que chaque chiot semblait présenter une augmentation de la charge excrétée jusqu'à arriver à un pic d'excrétion. Si le pic était observé avant le dernier jour d'étude, une diminution de la charge virale était ensuite mise en évidence.

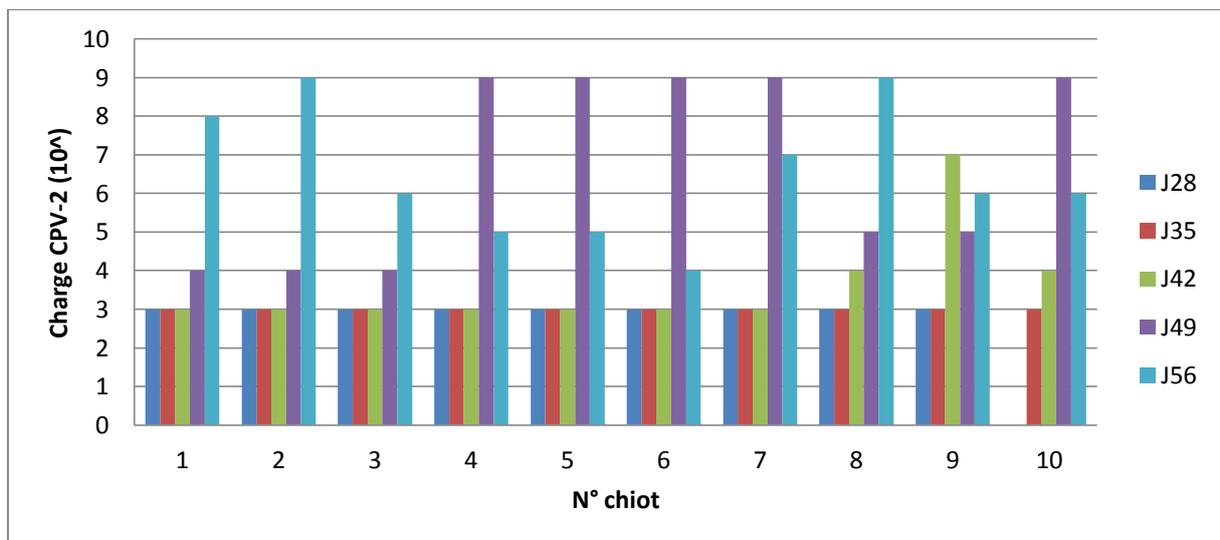


Figure 21 : Evolution de la charge en parvovirus (10⁴) excrétée en fonction de l'âge pour 10 chiots pris au hasard dans l'échantillon étudié.

En revanche, le profil d'excrétion des chiots en coronavirus semblait différent. La Figure 22 illustre pour les mêmes 10 chiots pris au hasard dans l'élevage l'évolution de leur

charge excrétée en CCV au cours du temps. On remarque ainsi que chaque chiot semblait augmenter rapidement jusqu'aux charges maximales, puisque 92% des chiots atteignirent le maximum quantifiable, et y restèrent ensuite les semaines suivantes, contrairement à l'excrétion du parvovirus qui elle semblait augmenter jusqu'à un pic d'excrétion d'une durée d'une semaine. Ici, le coronavirus semblait plutôt atteindre un plateau d'excrétion maximale. Les chiots furent donc excréteurs de coronavirus à des charges très importantes sur une période beaucoup plus longue que pour le parvovirus.

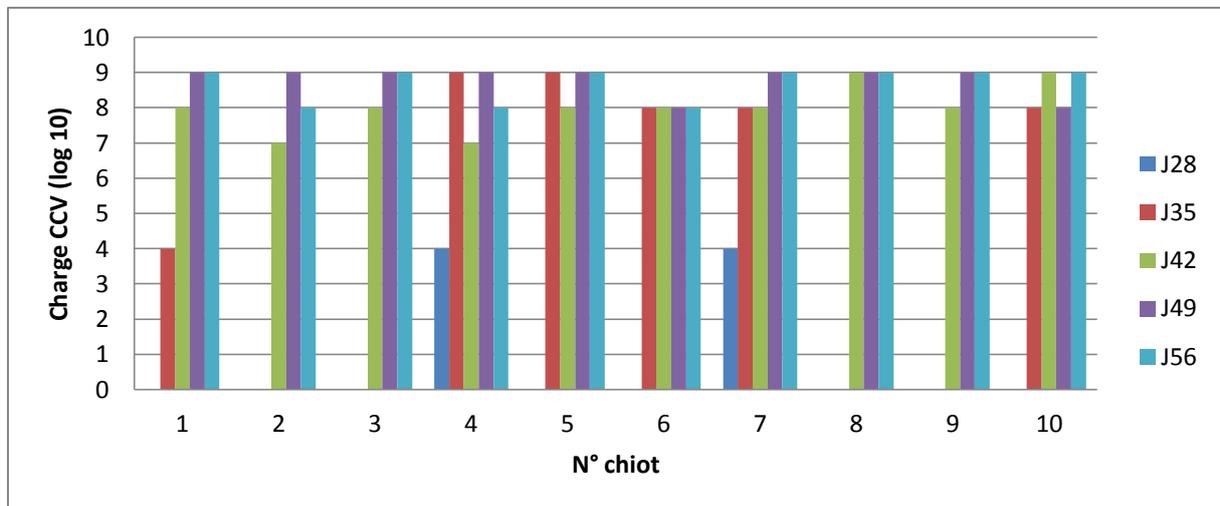


Figure 22 : Evolution de la charge en coronavirus (log 10) excrétée en fonction de l'âge pour 10 chiots pris au hasard dans l'échantillon étudié.

On retrouve ce résultat si l'on s'intéresse aux chiots excréteurs la puissance de 10 maximale (10^9 copies/écouvillon) (40% des chiots pour le parvovirus et 92% pour le coronavirus). On voit alors que cette excrétion majeure n'était jamais retrouvée lors de deux PCR consécutives ou plus en parvovirus (Figure 23a) contrairement au coronavirus où elle était retrouvée dans 70% des cas lors de plus de deux PCR consécutives (Figure 23b).

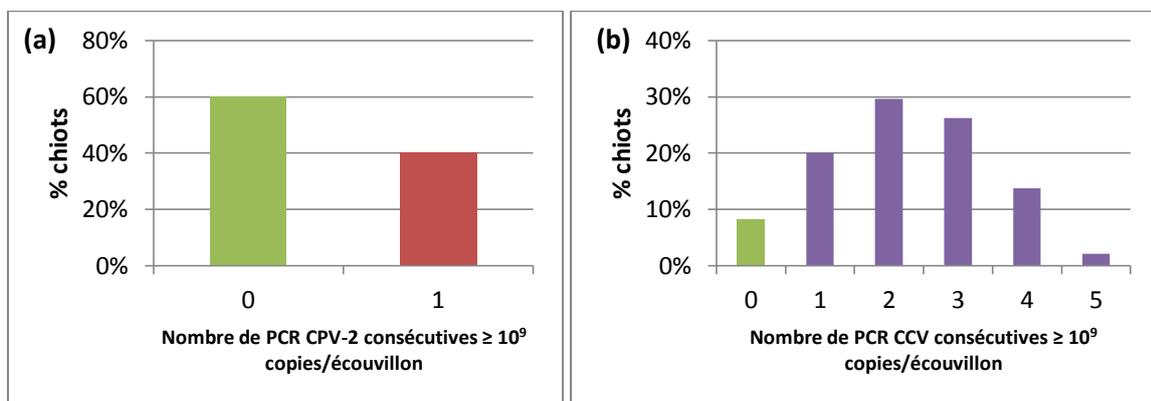


Figure 23 : (a) : Proportion de chiots en fonction du nombre de PCR consécutives ayant une charge en parvovirus $\geq 10^9$ copies/écouvillon ; (b) ayant une charge en coronavirus $\geq 10^9$ copies/écouvillon, n=145 chiots.

Le poids à 21j et la taille de la portée n'avaient pas d'effet sur l'évolution des charges virales au cours du temps. En revanche, il y a eu un effet significatif de l'interaction entre le format racial et l'âge du chiot sur l'excrétion en parvovirus ($p=0,001$) et du format racial seul sur l'excrétion en coronavirus ($p=0,03$). Ainsi, les grandes races excrétèrent en moyenne des charges virales en parvovirus et en coronavirus plus importantes (une puissance de 10 d'écart en moyenne) que les chiens de petites races (Figure 24).

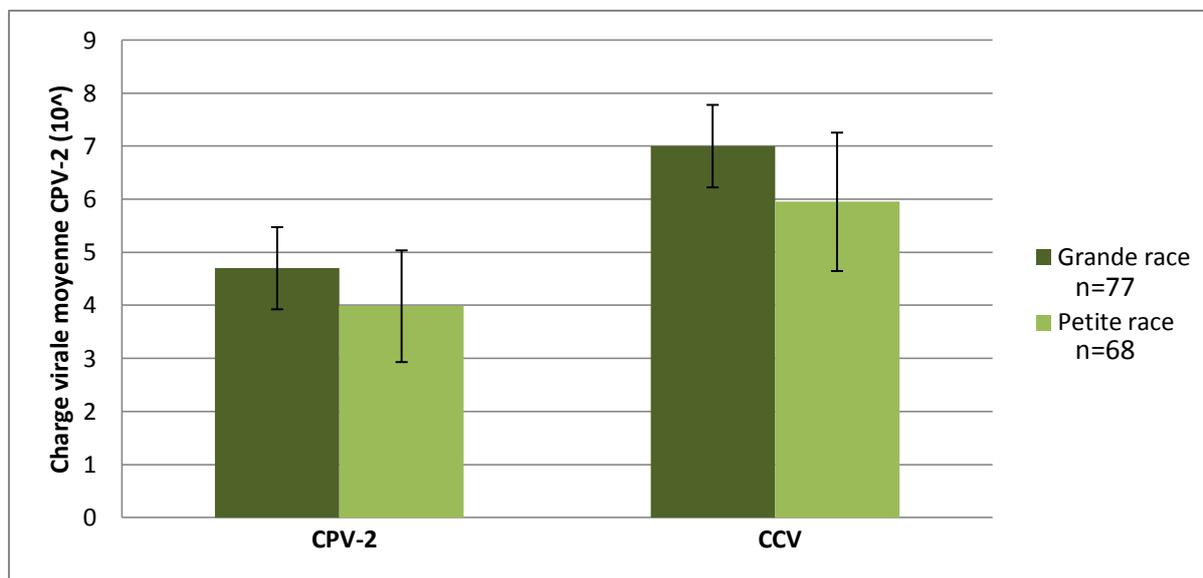


Figure 24 : Charge moyenne excrétée (10^x) en CPV-2 et CCV sur toute la période d'étude (J28-J56) en fonction de la taille de la race (moyenne \pm écart-type), n=725 prélèvements.

De plus, la Figure 25 présente la charge moyenne excrétée en parvovirus au cours du temps en fonction du format racial : les chiots de grande race présentèrent un profil d'excrétion plus précoce et avec des charges plus importantes au cours du temps que les chiots de petites races, ce qui est en accord avec le fait que leur début d'excrétion et leur pic d'excrétion étaient plus précoces et avec des charges plus élevées que les petites races, comme vu précédemment (Figure 16 et 18).

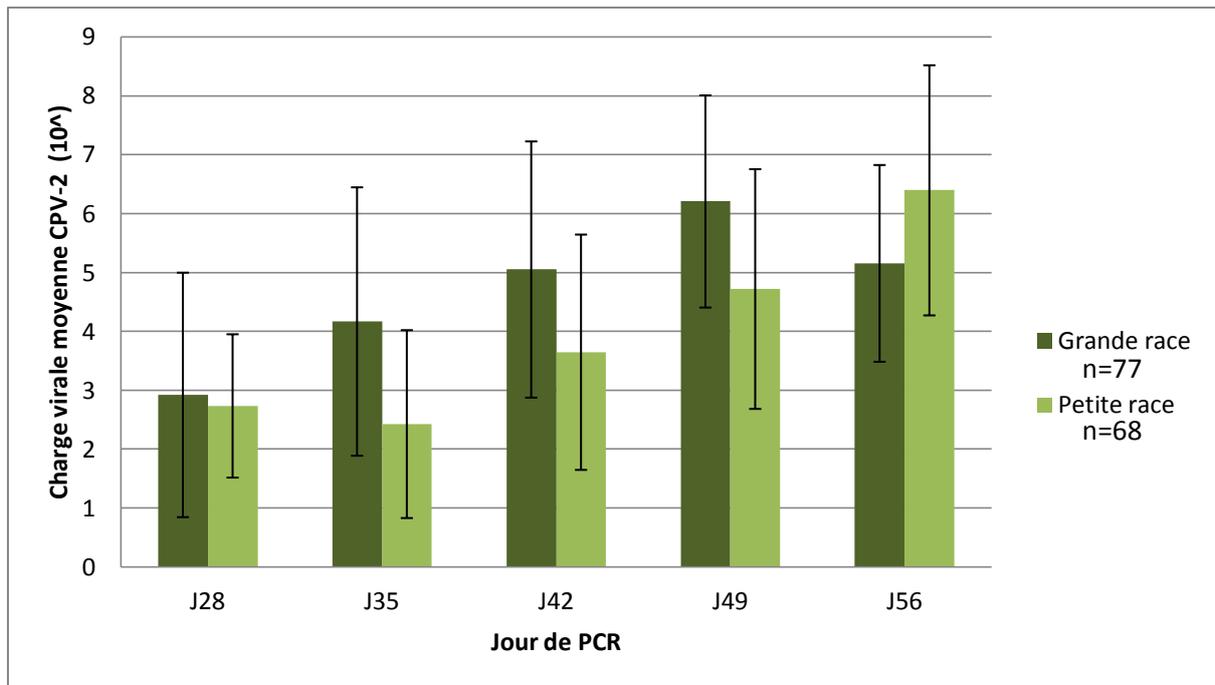


Figure 25 : Charge moyenne excrétée (10^6) en CPV-2 en fonction de la taille de la race (moyenne \pm écart-type).

2.6. Cinétique d'excrétion par portée

Nous nous sommes intéressés à la cinétique d'excrétion au sein de chaque portée, pour déterminer si tous les chiots d'une même portée étaient touchés au même âge ou si les virus commençaient par toucher un seul chiot puis gagnaient le reste de la portée. Pour cela, nous n'avons pris en compte que les 22 portées (N=108 chiots) pour lesquelles les données étaient disponibles pour tous les chiots de la portée (tous les chiots des portées de l'étude n'ayant pas été inclus). Le nombre de chiots par portée excréteur une charge considérée comme importante (fixée à $\geq 10^6$ copies/écouvillon) était de 0,3 chiots en moyenne/portée à J28, 2,3 chiots à J56. Ainsi, le pourcentage de chiots excréteurs de charges importantes en CPV-2 par portée variait de 4% à J28 à 52% à J56 (Figure 26).

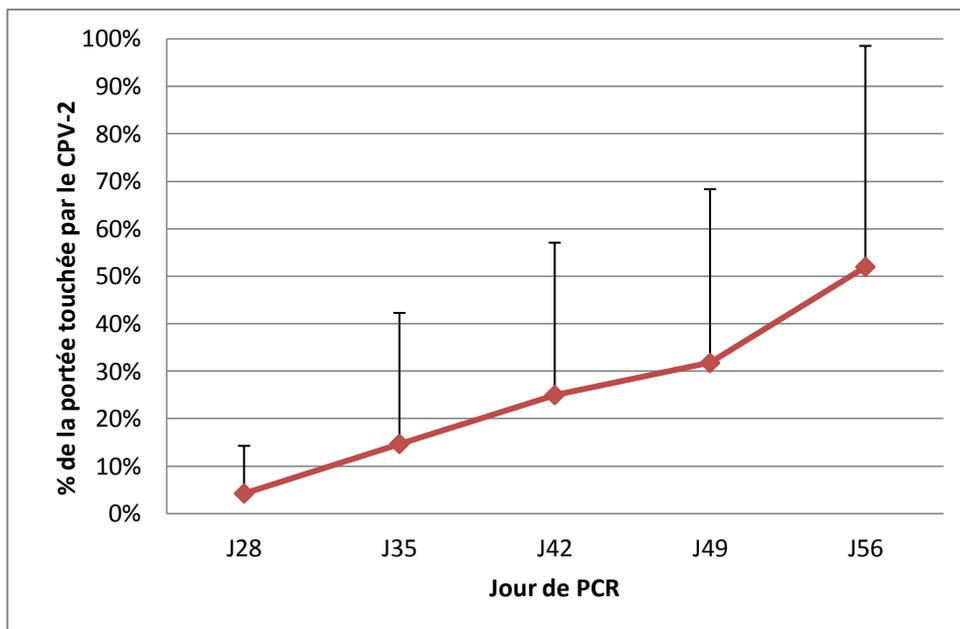


Figure 26 : Proportion moyenne de chiots de la portée excréant une charge en parvovirus $\geq 10^6$ copies/écouvillon au cours du temps (moyenne \pm écart-type).

Concernant le coronavirus, il était plus difficile d'étudier l'apparition dans une portée puisque dans notre échantillon d'étude, nous avons vu que le début d'excrétion du coronavirus apparaissait de manière plus précoce et importante dès J35. Ainsi, à J28 0,7 chiots en moyenne/portée étaient excréteurs $\geq 10^6$ copies/écouvillon, 2,8 dès J35 puis 4,7 chiots de J42 à J56, soit 15% (J28), 49% (J35) à 97% (J56) de la portée touchée en moyenne (Figure 27).

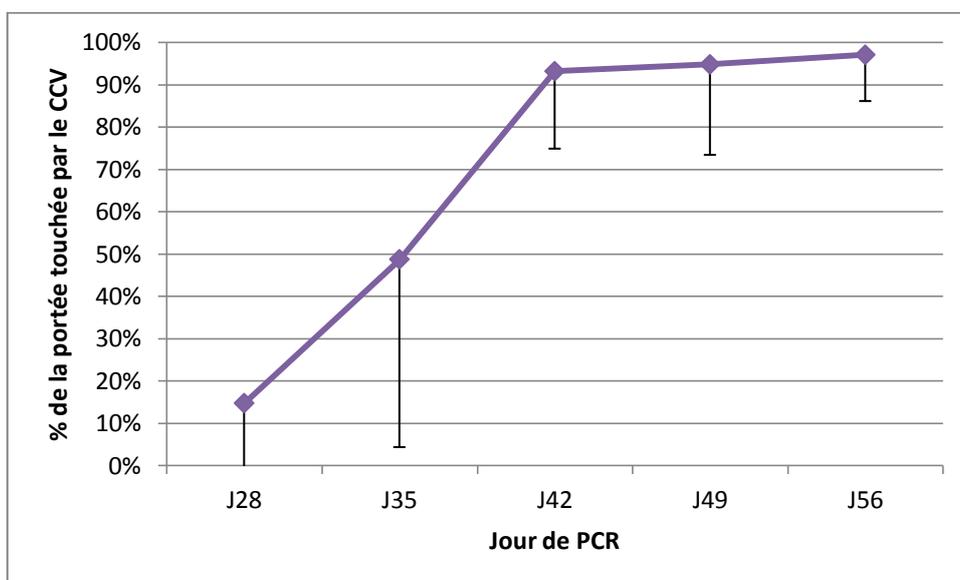


Figure 27 : Proportion moyenne de la portée excréant une charge en coronavirus $\geq 10^6$ copies/écouvillon au cours du temps (moyenne \pm écart-type).

Comme nous l'avons vu, les chiots excrètent précocement puis sur une longue période des charges importantes en coronavirus, ce qui n'a pas rendu possible d'étudier une possible coopération entre les deux virus, notamment si l'apparition de l'un était liée à une augmentation de la charge excrétée en l'autre virus plus importante.

Pour conclure sur cette première partie d'étude de la cinétique d'excrétion des charges, le Tableau 3 résume les principales observations ainsi que les différents facteurs de variations mis en évidence.

Tableau 3 : Principales observations et facteurs de variation influençant les charges excrétées en parvovirus et coronavirus

	CPV-2	CCV
Date du début d'excrétion	Effet format racial p= 0,066 Les chiots de grande race tendent à excréter pour la 1 ^{ère} fois plus tôt du CPV-2 que les chiots de petites races	0
Date du pic d'excrétion	Effet format racial p= 0,072 Les chiots de grande race tendent à faire un pic de CPV2 plus tôt que les chiots de petites races	0
Charge au pic d'excrétion	0	0
AUC excrétion	0	Effet format racial p= 0,01 Les chiots de grande race excrètent plus de CCV que les chiots de petite race
Cinétique d'excrétion (28-56 jours)	Effet période p<<0,001 Les chiots excrètent des charges en CPV-2 de plus en plus importantes au cours du temps Effet format racial * période p=0,001 Les chiots de grandes races excrètent des charges en CPV-2 plus importantes et plus précocement au cours du temps que les chiots de petite race	Effet période p<<0,001 Les chiots excrètent des charges en CCV de plus en plus importantes au cours du temps Effet format racial p=0,03 Les chiots de grandes races excrètent des charges en CCV plus importantes que les chiots de petite race

Maintenant que nous avons vu les charges circulantes en parvovirus et en coronavirus dans la population étudiée, intéressons-nous aux signes cliniques présents dans la population étudiée, pouvant être des répercussions cliniques des charges virales.

3. Impact clinique de l'infection virale

3.1. Description des signes cliniques et cinétique d'apparition

3.1.1. Hyperthermie, perte de poids et diarrhée

Les premiers signes cliniques ont été observés durant la 4^{ème} semaine S4. Entre 4 et 8 semaines, 39% des chiots ont présenté au moins un épisode d'hyperthermie, 27% au moins une perte de poids et 35% au moins un épisode de diarrhée (Figure 28a). Ainsi, au moins un des 3 signes cliniques a été détecté chez 66% des chiots (n=95/145) (Figure 28b). Ces trois signes étaient observés en grande majorité que pendant une semaine (Figure 29).

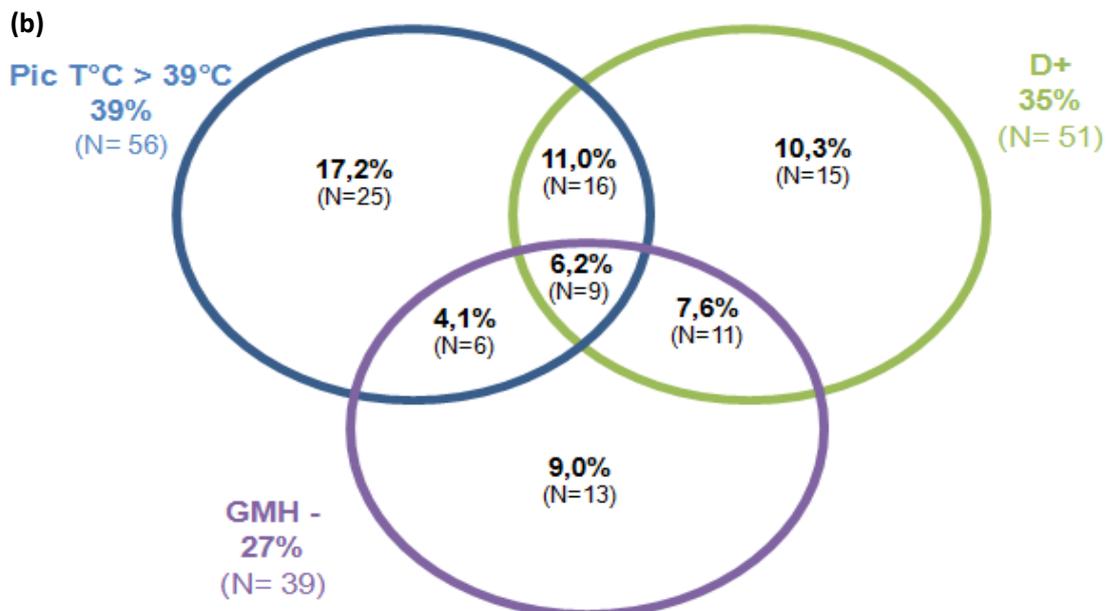
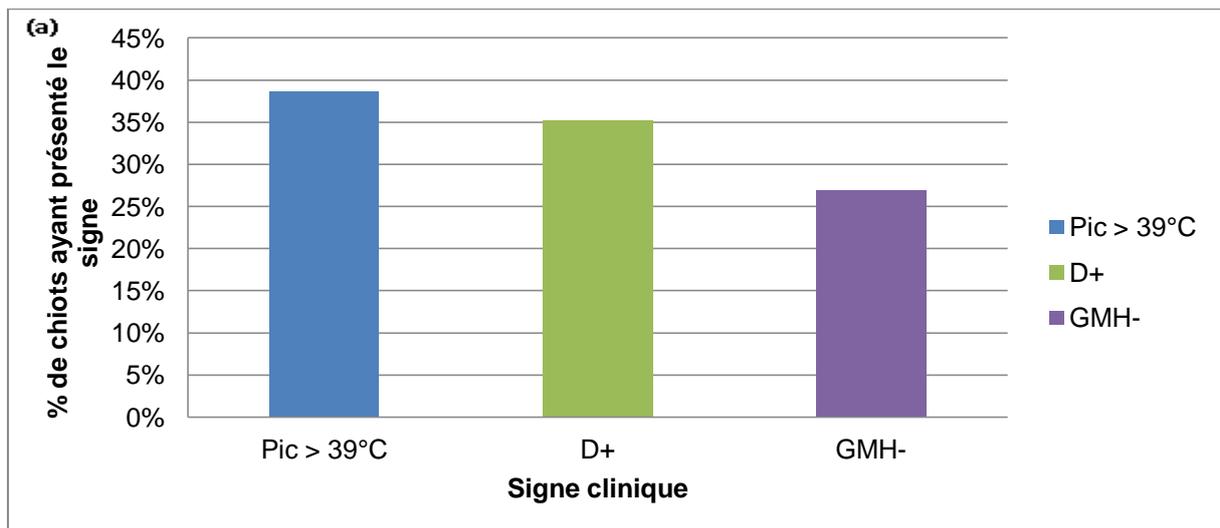


Figure 28 : (a) Fréquence des signes cliniques hebdomadaires (pic d'hyperthermie T°C>39°C, perte de poids GMH-, diarrhée D+) (b) : Association des signes cliniques hebdomadaires sur toute la période S4-S8, n=145 chiots.

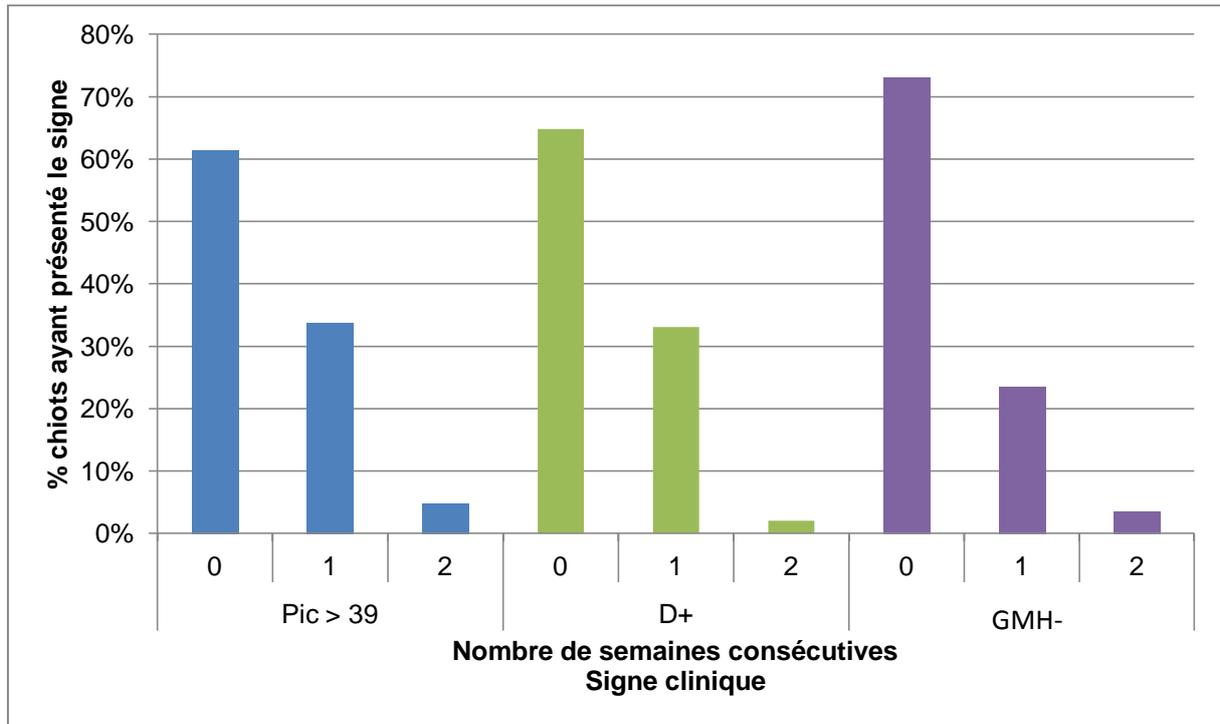


Figure 29 : Durée des signes cliniques (hyperthermie pic T°C>39, diarrhée D+, perte de poids GMH-) en nombre de semaines.

Nous nous sommes également intéressés à la cinétique d'apparition de chacun des signes suivant l'âge du chiot (en semaines). En effet, l'âge fut le facteur ayant eu le plus d'influence sur l'incidence de chacun des signes ($p < 0,001$ pour les trois signes cliniques). Les trois signes évoluèrent de façon similaire au cours du temps, avec une augmentation semaine après semaine (Figure 30). Ainsi, à 4 semaines d'âge (S4), moins de 1% des chiots présentaient une hyperthermie, de la diarrhée ou une perte de poids contre environ 20% lors de la 8^{ème} semaine (S8), respectivement 21%, 19%, 14% pour l'hyperthermie, la diarrhée et la perte de poids (Tableau 4). Chaque chiot présentera principalement un signe clinique par semaine et rares furent les chiots à avoir présenté les deux ou trois signe la même semaine, même si sur toute la période les combinaisons d'au moins deux signes chez un même chiot ont touché 38% de tous les chiots (Figure 28).

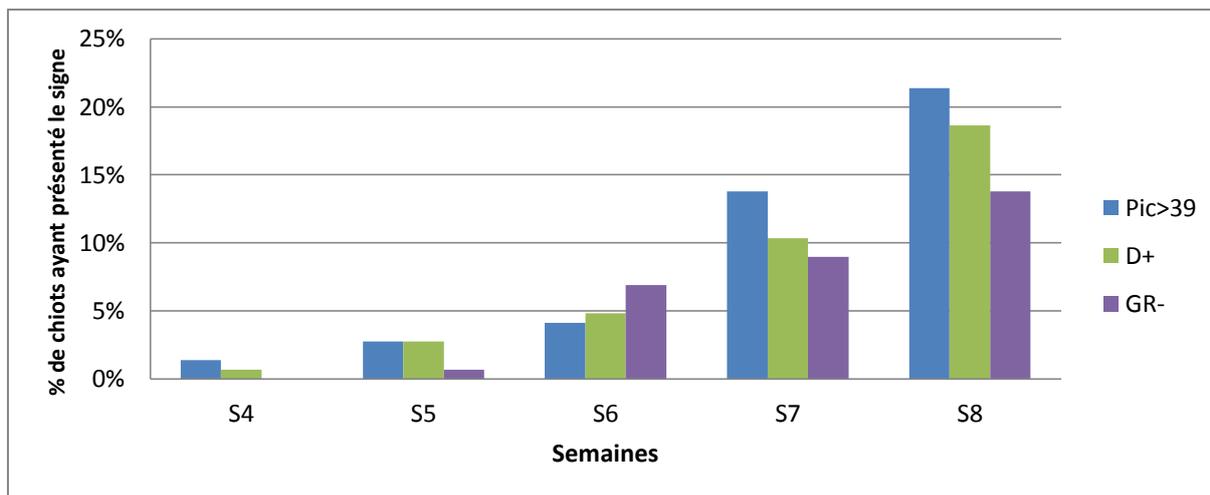


Figure 30 : Evolution de la proportion de chiots ayant présenté un signe clinique hebdomadaire (pic d'hyperthermie T°C>39°C, perte de poids GMH-, diarrhée D+) en fonction de l'âge, n=145 chiots.

Tableau 4 : Evolution des proportions de chiots présentant un signe clinique hebdomadaire (pic d'hyperthermie >39°C, une perte de poids GMH-, une diarrhée D+) en fonction de l'âge des chiots.

Chiots % (Effectif)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	TOTAL (au moins une fois entre S4-S8)
Pic >39°C	0	0	0	1% (2/145)	3% (4/145)	4% (6/145)	14% (20/145)	21% (31/145)	39% (56/145)
GMH -	2% (3/145)	1% (2/145)	0	0	1% (1/145)	7% (10/145)	9% (13/145)	14% (20/145)	27% (39/145)
D+	0	0	0	1% (1/145)	3% (4/145)	5% (7/145)	10% (15/145)	19% (27/145)	35% (51/145)

3.1.2. Scores cliniques

Maintenant que nous avons vu que les trois signes apparaissent en proportion équivalente et ont la même cinétique d'apparition, nous les avons donc regroupés dans un score clinique hebdomadaire, noté sur 3. Ainsi, un chiot qui n'a présenté aucun signe clinique une semaine donnée se voit attribuer le score de 0/3, et un chiot qui a présenté 1 signe ou plus sera noté de 1 à 3/3. Sur notre période d'étude de S4 à S8, comportant 5 semaines, chacun des 145 chiots a reçu 5 scores hebdomadaires, soit un total de 725 scores. Sur les 725 scores, 83% avaient un score nul 0/3, 13% un score de 1/3 et 4% un score >1/3.

Face au faible nombre de chiots ayant un score de 2 ou 3/3, il a alors été décidé d'instaurer un nouveau score clinique hebdomadaire cette fois-ci binaire, de la manière suivante : un chiot n'ayant présenté aucun signe clinique une semaine donnée fut scoré 0 tandis que tous les chiots ayant présenté au moins un signe (donc les chiots ayant un score entre 1 et 3/3) furent scorés 1. On retrouve ainsi le fait que sur toute la période d'étude, 34% des chiots n'ont présenté aucun signe clinique tandis que 66% ont eu au moins un

critère. La quantité de chiots présentant au moins un critère augmenta au cours du temps, jusqu'à atteindre 29% puis 41% aux semaines S7 et S8 respectivement (Figure 31).

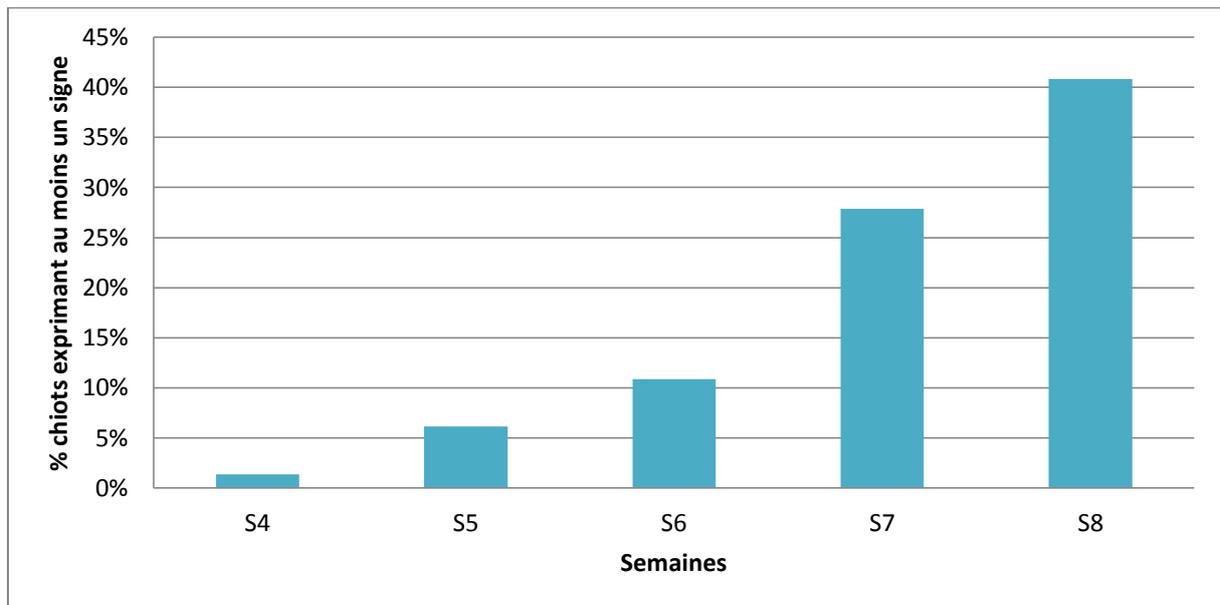


Figure 31 : Evolution de la proportion de chiots ayant présenté au moins un signe clinique hebdomadaire en fonction de la semaine de S4 à S8, n=145 chiots

3.1.3. Hospitalisation

Les chiots ont commencé à être hospitalisés à partir de la semaine S6, et au total 26% (n=37) des chiots ont été hospitalisés durant l'étude. Un seul chiot fut hospitalisé à deux reprises. Tout comme les signes cliniques, le taux d'hospitalisation augmenta avec l'âge du chiot ($p=0,006$). Ainsi, 12% et 10% des chiots furent respectivement hospitalisés aux semaines S7 et S8 (Figure 32).

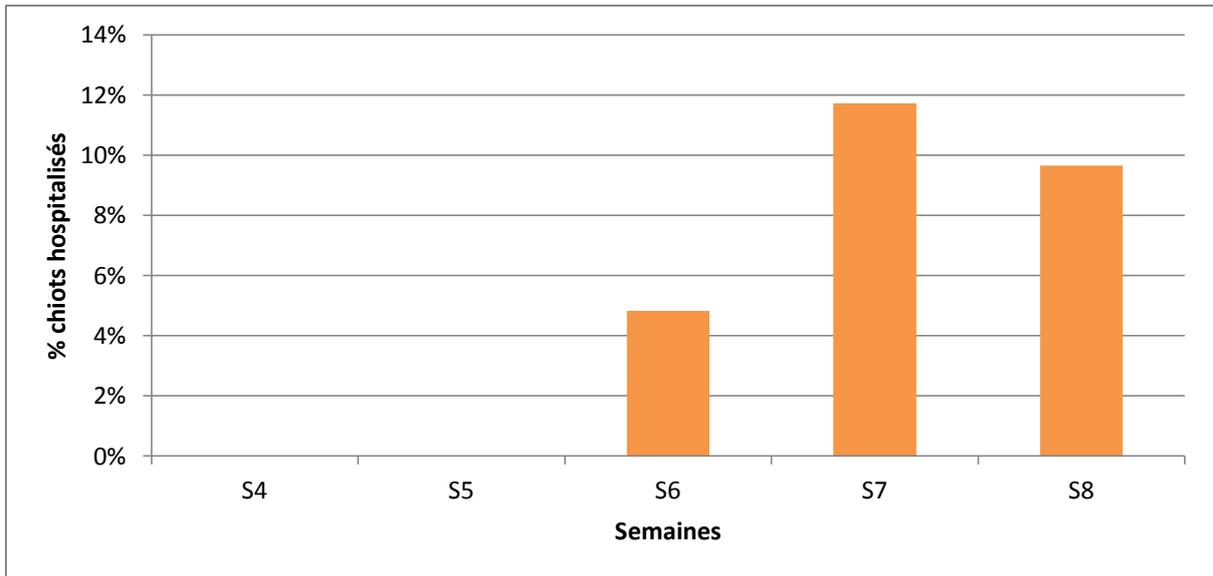


Figure 32 : Evolution du taux d'hospitalisation au cours des semaines de S4 à S8.

3.2. Relation entre les charges virales et les signes cliniques

3.2.1. Charges en parvovirus excrétées et clinique

La charge excrétée en parvovirus influença significativement ($p < 0,001$) la présence de signes cliniques la semaine précédant le jour de PCR. Ainsi, la proportion de chiots présentant des signes cliniques augmenta parallèlement à l'augmentation de la charge virale excrétée (Figure 33). Pour une charge $\geq 10^9$ copies/écouvillon, un chiot a eu 25% de chance d'avoir présenté un pic d'hyperthermie, une diarrhée ou une perte de poids.

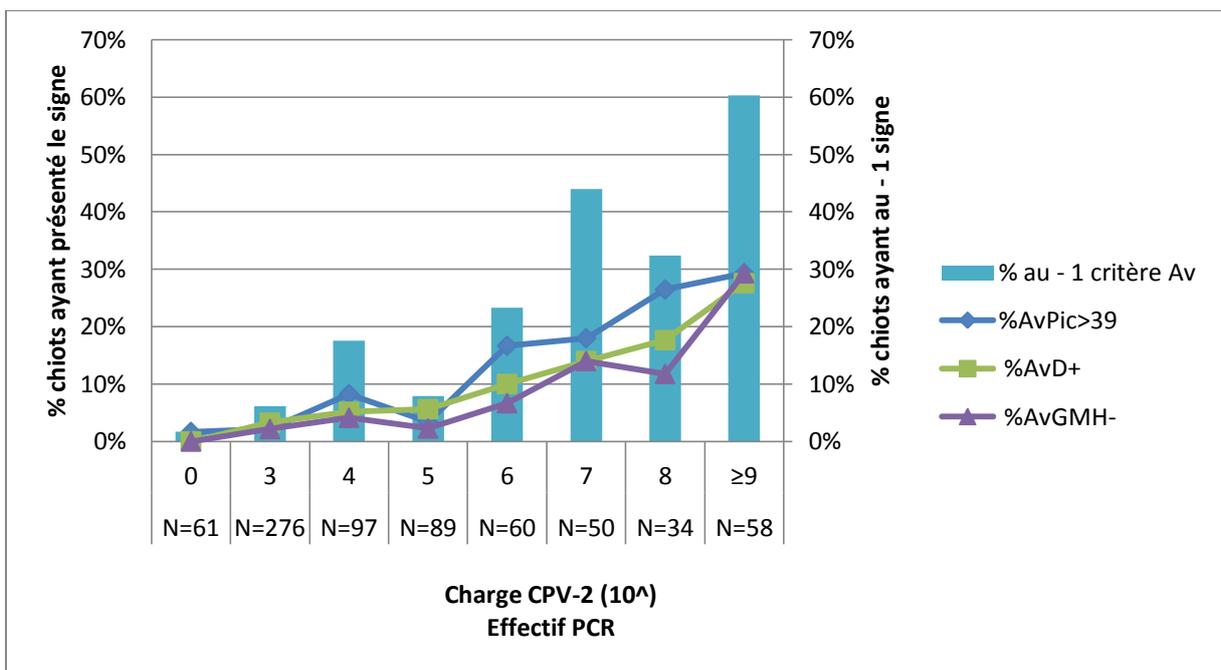


Figure 33 : Proportion de chiots ayant présenté au moins un signe clinique durant la semaine d'avant (Av) le jour de PCR, en fonction de la charge excrétée en parvovirus (10^x)

Afin d'évaluer à partir de quelle charge en CPV-2 la morbidité (hyperthermie, diarrhée, GMH- et hospitalisation) augmentait significativement, nous avons réalisé une analyse des courbes ROC pour les différents signes cliniques la semaine précédant les PCR en fonction de la charge en parvovirus (en valeur quantitative ou en 10^{\wedge}). Tous les résultats s'accordent avec des AUC>0,7 sur la valeur 10^6 copies/écouvillon (Tableau 5).

Tableau 5 : Valeurs seuils de la charge excrétée (quantitative « CPV-2 » ou en 10^{\wedge}) en parvovirus

	CPV-2	AUC [IC95%]	10^{\wedge} CPV-2	AUC [IC95%]
Hyperthermie	$> 1,15 * 10^6$	0,781[0,732-0,831]	≥ 6	0,778 [0,778-0,778]
Diarrhée	$> 9,06 * 10^5$	0,755[0,708-0,802]	≥ 6	0,752 [0,752-0,752]
GMH-	$> 1,63 * 10^6$	0,790 [0,725-0,855]	≥ 6	0,788 [0,788-0,788]
Hospitalisation	$> 9,06 * 10^5$	0,797 [0,730-0,863]	≥ 6	0,796 [0,796-0,796]
Au moins un signe clinique	$> 9,06 * 10^5$	0,785 [0,757-0,813]	≥ 6	0,782 [0,782-0,782]

En revanche, il n'y a pas d'effet significatif de la charge excrétée en parvovirus sur le taux d'hospitalisation la semaine d'avant ou la semaine d'après mais si on s'intéresse aux charges excrétées en parvovirus inférieures ou supérieures au seuil défini précédemment (10^6 copies/écouvillon), l'effet devient significatif ($p < 0,05$). Ainsi la Figure 34 révèle une augmentation de la proportion de chiots hospitalisés sur la quinzaine entourant le jour de PCR avec la charge excrétée dès que la charge excrétée devient supérieure à 10^6 copies/écouvillon. En effet, à partir d'une charge excrétée $\geq 10^6$ copies/écouvillon, le taux d'hospitalisation augmentait brusquement et restait stable autour de 15% pour des charges supérieures.

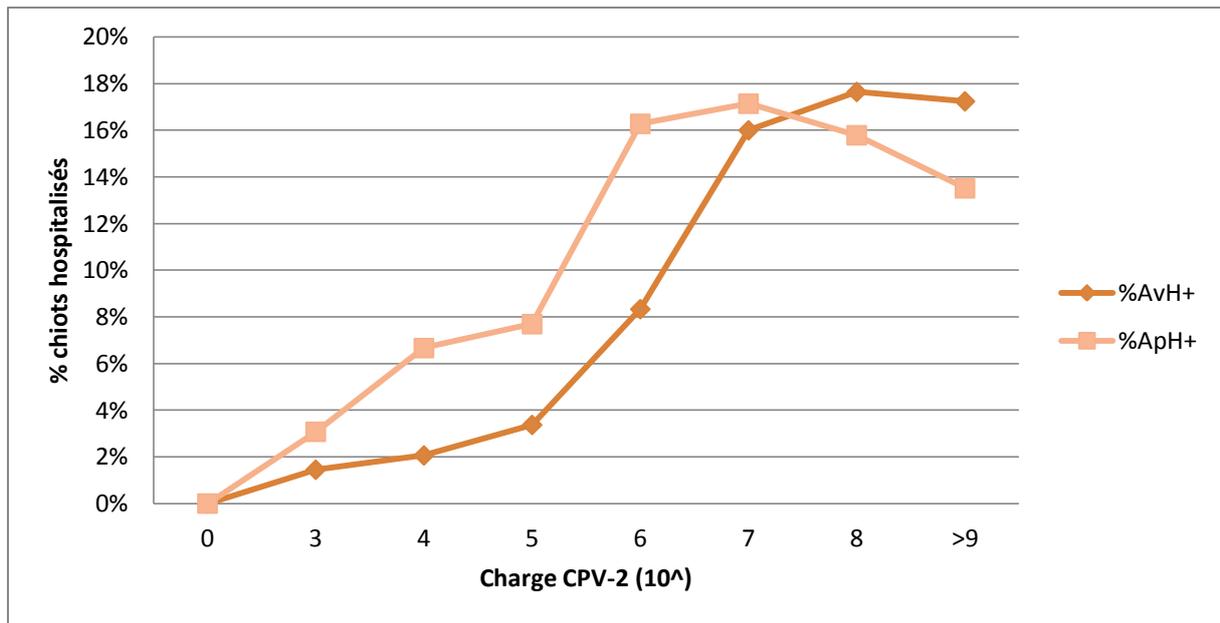


Figure 34 : Proportion de chiots ayant été hospitalisés (H+) durant la semaine d'avant (Av) et d'après (Ap) le jour de PCR en fonction de la charge excrétée en parvovirus (10^x)

3.2.2. Impact des charges en coronavirus excrétées

Comme nous l'avons vu précédemment, les chiots excrètent très tôt des charges en coronavirus très importantes et continuent à excréter de fortes charges les semaines suivantes, ce qui rend difficile l'interprétation d'une possible répercussion clinique, d'autant plus qu'une interaction de la co-infection par le CPV-2 est possible. Il n'y a en effet que 11 chiots excréant du parvovirus avec des charges inférieures au seuil pathologique ($\geq 10^6$ copies/écouvillon) et excréteurs uniquement de coronavirus, population trop faible pour une analyse statistique sur l'impact du coronavirus seul.

Néanmoins, l'analyse multivariée a montré une influence significative ($p=0,01$) de la charge excrétée en coronavirus sur à la fois la présence de signes cliniques (score clinique sur 3) et la présence d'au moins un signe clinique la semaine précédent le jour de PCR. Ainsi, on observe un effet cloche entre la proportion de chiots présentant un signe clinique et la charge excrétée en coronavirus, avec un pic à 10^7 copies/écouvillon (Figure 35). Alors que pour le parvovirus il fallait être au pic maximal des charges ($\geq 10^9$ copies/écouvillon) pour avoir le taux de morbidité le plus fort, il en est allé différemment pour le coronavirus. En effet, les proportions maximales de chiots présentant des signes cliniques étaient atteintes non pas pour les charges maximales, mais pour les charges de 10^6 et 10^7 copies/écouvillon. Ainsi, pour une charge de 10^7 copies/écouvillon, un chiot a eu 15% de chance (10% de moins que le maximum observée avec les charges de parvovirus) d'avoir présenté un pic d'hyperthermie, une diarrhée ou une perte de poids. Compte-tenu du taux de co-infection très important, l'imputabilité au coronavirus est impossible à établir.

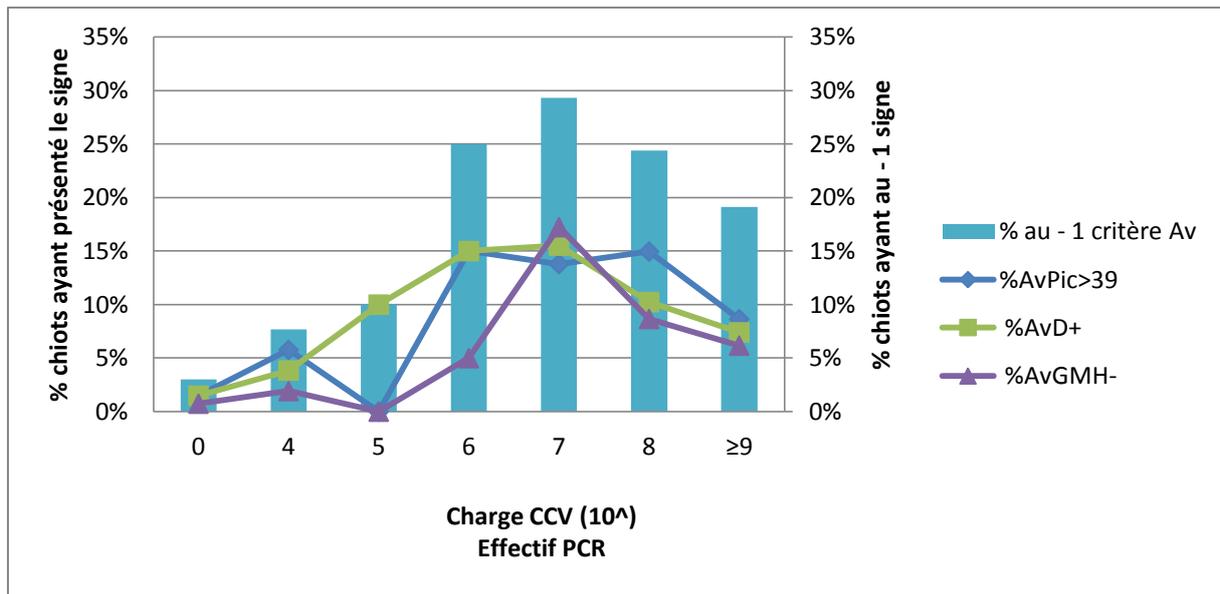


Figure 35 : Proportion de chiots ayant présenté au moins un signe clinique durant la semaine d'avant (Av) le jour de PCR, en fonction de la charge excrétée en coronavirus (10[^]), n=145 chiots

Les courbes ROC n'ont pu établir avec des AUC significatives de valeur pour un seuil pathologique en coronavirus, probablement car les chiots atteignirent très rapidement le maximum quantifiable et restèrent excréteurs de fortes charges jusqu'à la fin de la période d'étude.

3.3. Facteurs de variation des signes cliniques

Pour finir, nous avons ici étudié si certains facteurs influençaient la survenue d'un signe clinique chez les chiots. Il n'y a aucun effet de la taille de la portée ni du poids à 21j. En revanche, il y a un effet du format racial que nous allons maintenant détailler.

3.3.1. Effet du format racial

Le format racial avait un effet sur la présence d'une hyperthermie (p=0,03) et la perte de poids (p=0,022). Ainsi, les chiots de petit format ont eu tendance à présenter plus souvent une hyperthermie que les chiots de grande race, puisque 50% des chiots de petite race ont eu un pic d'hyperthermie contre 38% des chiots de grande race (Figure 36). En revanche, les chiots de grande race présentèrent plus souvent une perte de poids, 40% contre seulement 19% chez les chiots de petit format (Figure 37).

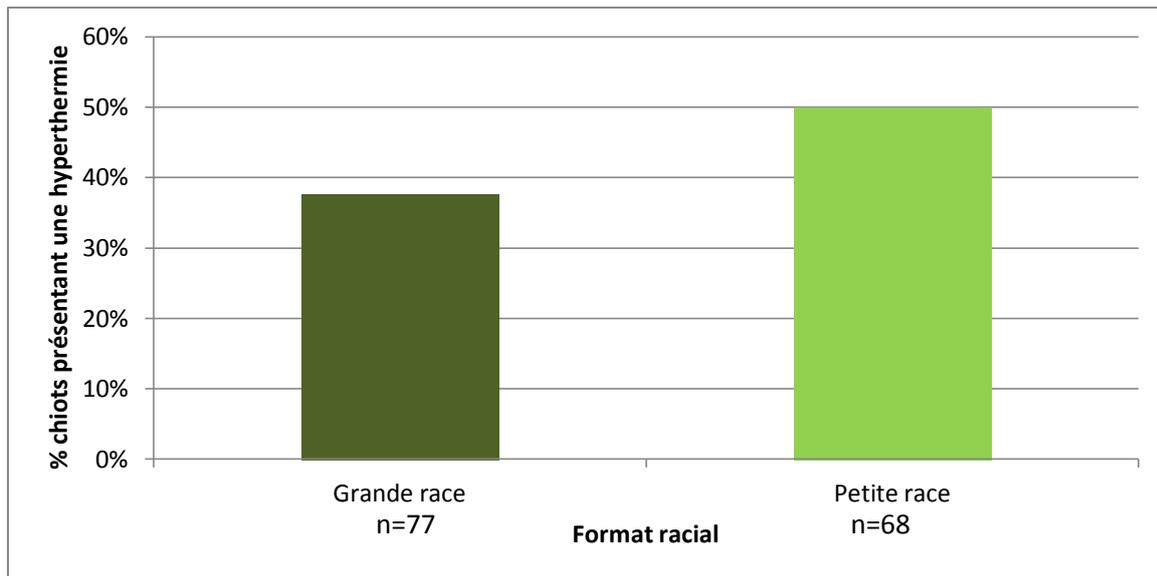


Figure 36 : Proportion de chiots ayant présenté un pic d’hyperthermie en fonction du format racial sur toute la période S4 à S8.

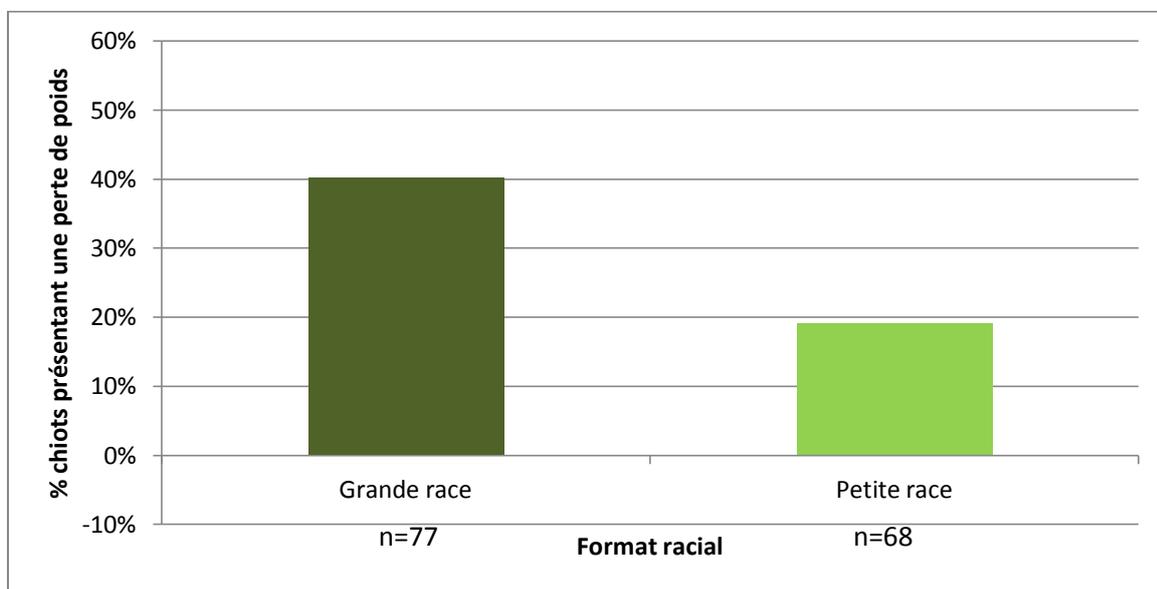


Figure 37 : Proportion de chiots ayant présenté une perte de poids en fonction du format racial sur toute la période S4 à S8.

III. Discussion

L'originalité de ce travail est d'avoir observé une co-infection naturelle du parvovirus et du coronavirus chez des chiots d'un même élevage, à la différence de la plupart des études où des inoculations expérimentales ont été réalisées (Elia et al, 2005 ; Decaro et al, 2004a ; Decaro et al, 2005b ; Meunier et al, 1985b). Nous avons ainsi noté la forte prévalence à la fois du parvovirus et du coronavirus dans un élevage où les mères étaient correctement vaccinées contre CPV-2 et les locaux régulièrement désinfectés. Il a été observé des profils d'excrétion très différents entre les deux virus. Les charges excrétées ont eu un effet sur la morbidité des chiots, avec un seuil d'excrétion virale en parvovirus déterminé comme pathologique au dessus de 10^6 copies/écouvillon. Le format racial a également eu des effets sur la charge virale et son profil d'excrétion, ainsi que sur l'impact clinique de l'infection.

1. Les limites de l'étude

1.1. Population étudiée

Un nombre important de chiots a été inclus dans notre étude : 145 chiots de 31 portées. Ils ont tous été soumis aux mêmes conditions d'élevage. En effet, appartenant au même élevage, ils ont reçu la même gamme d'alimentation (adaptée au format du chiot) et des protocoles de vermifugation et de vaccination des mères identiques. Ils ont également été soumis aux mêmes conditions environnementales : mêmes agents infectieux, conditions d'hygiène similaires (nettoyage des box identique pour toutes les portées) et à des ambiances semblables (luminosité, températures, chauffage...).

L'effectif de notre étude était relativement important si on compare à d'autres études ayant étudié une infection en parvovirus ou en coronavirus (n=6 (Decaro et al, 2005b), n=22 (Meunier et al, 1985b)) en dehors de celle de Decaro et al (2005a) qui ont étudié l'excrétion en coronavirus sur 174 chiots en diarrhée en Italie.

En revanche, seules 6 races différentes ont été incluses dans notre étude, les chiots de grande race n'étant représentés que par des Golden Retriever et des Labrador Retriever avec une sur-représentation des Golden Retriever. Ces races sont peu étudiées dans la littérature consacrée au parvovirus (les grandes races déjà étudiées étant principalement le Doberman et le Rottweiler (Houston et al, 1996)). Même si toutes les études ne s'accordent pas sur l'existence d'une sensibilité différente au CPV-2 selon la race, notre protocole ne permet pas de l'étudier, d'autant qu'aucun chiot de race moyenne n'a été inclus dans l'étude. Aucune donnée sur les variations inter-raciales n'est disponible pour le coronavirus.

Néanmoins, nous avons randomisé les chiots de façon à ce que le ratio grande race : petite race et mâle : femelle soit équilibré.

Enfin, réaliser une étude dans un seul élevage présente des inconvénients. Les résultats obtenus peuvent ne pas être extrapolables à d'autres situations d'élevage. Pour plus de représentabilité des résultats, l'étude devrait être répétée dans d'autres élevages.

Or, il semblerait que les situations de co-infection CPV-2/CCV soient rencontrées dans plusieurs dizaines d'élevage en France.

1.2. Données cliniques collectées

Nous avons fait un choix dans les signes cliniques que nous avons retenus. Miranda et al (2015) ont montré que l'abattement, la déshydratation et la température rectale étaient les signes les plus corrélés à l'infection par le parvovirus. Dans notre étude, ni la présence de vomissements, ni de déshydratation n'ont été incluses par manque de données pour un certain nombre de chiots, mais auraient pu être des critères intéressants à observer, notamment pour savoir si les vomissements sont aussi corrélés à la charge excrétée en CPV-2. Nous avons uniquement noté la présence ou non de chaque signe clinique, la sévérité n'a ici pas été prise en compte, puisqu'il semblerait qu'elle ne soit pas liée à la présence de l'un ou l'autre virus (Godsal et al, 2010) mais elle aurait pu être fonction de la charge. De plus, il a fallu déterminer un seuil pour l'hyperthermie. La température du chiot augmente de la naissance au sevrage avec des variations liées à l'environnement, au format racial et au poids (Piccione et al, 2010). La température rectale chez les chiots nouveau-nés est de 35,6°C durant la première semaine de vie puis augmente progressivement jusqu'à atteindre 38,1°C à J21. La température adulte est atteinte à l'âge de 7 semaines. Ainsi, un chiot est considéré hypertherme quand sa température rectale dépasse 39,5°C (Piccione et al, 2010). Or, si on regarde la température moyenne de la population de chiots étudiée au cours du temps, nous sommes en moyenne 0,5°C sous les valeurs moyennes de la littérature (avec des écart-types faibles), puisque la température moyenne de 38,1°C n'était atteinte dans notre population qu'à la 6^{ème} semaine. Ainsi, nous avons choisi d'abaisser le seuil d'hyperthermie des chiots de 0,5°C pour être en accord avec l'écart de température observé. Ainsi, nous avons considéré qu'un chiot était hypertherme s'il dépassait 39°C.

Le fait d'avoir enregistré des données cliniques tous les jours, notamment la température, ou toutes les semaines, comme le poids, a entraîné des manipulations humaines supérieures aux conditions d'élevage en temps normal. Malgré les conditions d'hygiène mises en œuvre lors de la manipulation des chiots (gants jetés entre chaque portée, désinfection des tabliers, des bottes ...), on peut se demander si la manipulation quotidienne d'un aussi grand nombre de chiots n'a pas favorisé la circulation d'agents pathogènes. Nous avons en effet remarqué un probable effet chronologique au cours de notre étude dans le sens où les portées de l'étude nées le plus tardivement ont commencé à excréter des charges virales plus tôt que les premières portées incluses dans l'étude. Discuter d'un possible effet saisonnier sur le parvovirus ou le coronavirus n'a donc pas pu être envisagé mais il serait intéressant de renouveler le protocole en le faisant débiter plus tard.

1.3. Données PCR

La technique d'identification du CPV-2 et du CCV respectivement par PCR ou RT-PCR en temps réel donne des résultats quantitatifs avec une excellente sensibilité et spécificité (Decaro et al, 2005a et 2005b). La technique que nous avons utilisée dans cette étude est actuellement la technique la plus fiable et celle qui permet de mieux quantifier les quantités virales excrétées. Néanmoins, la méthode d'écouvillonnage, méthode de choix pour étudier l'excrétion fécale, reste une méthode non standardisée, les écouvillons étant plus ou moins chargés en matières fécales, donc en virus. De plus, la PCR ne permet pas de distinguer la part de virus vivant et de virus mort dans la quantité de virus détectée. Comme les profils d'excrétion montrent une augmentation des charges au cours du temps chez les chiots, cela est néanmoins plutôt en faveur d'une détection de virus vivant qui se développe dans l'organisme du chiot. Des PCR sur des prélèvements environnementaux en maternité ont montré que la charge virale environnementale restait stable au cours du temps et donc que le virus ne se développait pas dans l'environnement mais uniquement chez les chiots.

L'échantillonnage des chiots à partir de J28 ne nous permet pas de dire s'ils excrètent du parvovirus ou du coronavirus avant et donc de savoir quel est le premier virus à avoir été excrété dans cet élevage. Il serait intéressant de mieux évaluer le moment où les chiots commencent à excréter l'un ou l'autre des virus pour connaître leur rôle dans la cinétique d'excrétion virale et dans les répercussions cliniques.

2. Bilan des résultats et comparaison aux données de la littérature

Cette étude a permis de connaître la prévalence du parvovirus et du coronavirus sur des chiots présentant des signes cliniques dans un élevage.

2.1. Charges excrétées en parvovirus et coronavirus

Les charges observées dans notre étude étaient des charges de haut niveau d'excrétion, puisque nous avons vu que les chiots atteignirent une valeur au pic d'excrétion en moyenne de 10^8 en CPV-2 et 10^9 copies CCV par écouvillon. De telles charges ont déjà été observées dans des études précédentes, aussi chez des chiots infectés naturellement : par exemple, Grellet et al (2012a) ont observé des chiots excrétant des charges virales supérieures à $10^{10,3}$ copies par écouvillon pour le parvovirus, et $10^{9,3}$ copies par écouvillon pour le coronavirus. Elia et al (2005) ont également mesuré par PCR l'excrétion fécale en parvovirus sur 12 chiens inoculés expérimentalement par une souche de CPV-2b et ont observé des titres médians variant de $4,64 \times 10^7$ copies/mg de fèces à $1,55 \times 10^8$ copies/mg de fèces suivant la quantité inoculée. L'étude de Decaro et al (2005a) s'est intéressée à la quantification du coronavirus type I et II par RT-PCR sur 174 chiots en diarrhée en Italie : les titres en CCV de type I étaient plus hauts que ceux de type II mais ces titres sont plus faibles que les titres observés dans notre étude, puisque les titres médians étaient de $9,14 \times 10^4$ copies par écouvillon pour le type I et $2,24 \times 10^4$ copies par écouvillon pour le type II.

2.2. Cinétique d'excrétion en parvovirus et coronavirus

Nous avons vu que l'effet de l'âge sur l'excrétion en parvovirus et en coronavirus était très significatif, avec une augmentation de la charge excrétée au cours des semaines. Le début d'excrétion en parvovirus apparaissait dans des proportions similaires au cours des 4 premières semaines (25% des chiots deviennent excréteurs chaque semaine) alors que le début d'excrétion du coronavirus se localisait surtout à J35 et J42. Ainsi, 64% des chiots étaient excréteurs de CCV avant J42 et quasiment tous les chiots (97%) étaient excréteurs avant J49. La première excrétion en coronavirus semblait donc toucher plus rapidement les chiots dans le temps que celle du parvovirus mais c'est le parvovirus qui touchait en premier. Ceci a déjà été rapporté dans la littérature puisque Godsall et al (2010) ont également remarqué sur un large effectif de chiots au Royaume-Uni que les chiots infectés par le CPV-2 ont eu tendance à être plus jeunes que ceux infectés par le CCV, ce qui laisserait penser que les facteurs de risque pour les deux virus ne sont pas les mêmes. Néanmoins, même si le début d'excrétion du coronavirus apparaissait un peu plus tard, à J35, la proportion de chiots excréteurs augmenta beaucoup plus brutalement que le parvovirus puisqu'à J42 déjà 96% des chiots excrétaient des charges $\geq 10^7$ copies/écouvillon. De même, concernant le pic d'excrétion en coronavirus, il était atteint plus précocement, puisque 55% des chiots l'ont atteint avant J49 alors que le pic en parvovirus apparaissait un peu plus tard avec seulement 31% des chiots ayant leur pic à J49. De plus, 92% des chiots ont atteint le maximum quantifiable en coronavirus alors qu'il n'était atteint pour le parvovirus que par uniquement 40%. La valeur du pic d'excrétion n'était en revanche pas modifiée suivant sa période d'apparition, alors qu'on aurait pu penser que les chiots présentant un pic plus tardif auraient eu le temps de développer une immunité contre le virus et ainsi limiter son excrétion.

On retrouve également cette différence dans les profils d'excrétion des deux virus. Dans la littérature, peu d'études se sont intéressées spécifiquement à l'évolution des excréments fécaux du parvovirus et du coronavirus. Il est rapporté que l'excrétion fécale du parvovirus et du coronavirus peut se poursuivre sur une période de 4-5 semaines (39 jours observées pour le parvovirus (Elia et al, 2005), 37 jours en moyenne pour le coronavirus (Keenan et al, 1976)). Dans l'étude de Elia et al (2005), la cinétique d'excrétion du CPV-2 n'a pas été détaillée mais il apparaît sur les graphiques une cinétique similaire à la nôtre, avec un pic d'excrétion à 10^9 copies/mg de fèces durant environ 6 jours avant une diminution, et un début d'excrétion débutant 5 jours après l'inoculation. En effet, le parvovirus semble être excrété sur un seul pic d'une semaine pour plus de 50% des chiots. Van Nguyen et al (2006) ont également observé sur des chiots inoculés par voie orale par CPV-2 une excrétion variant de 6,6 à 11,8 jours. Le coronavirus, quant à lui, atteint rapidement une excrétion maximale, excrétion qui reste ensuite permanente pendant au minimum 3 semaines pour 93% des chiots. L'étude de Decaro et al (2005a) a observé la cinétique d'excrétion en CCV que pour 3 chiots infectés expérimentalement : l'excrétion a été observée sur 67 à 90 jours (lors de co-infection avec le type I et II), avec un plateau d'excrétion du 2ème au 16ème jour, soit

environ de 2 semaines donc moins longue que dans notre étude. Le fait d'observer une excrétion plus longue en coronavirus rejoint les observations de Pratelli et al (2003b) qui ont détecté du coronavirus dans les selles de chiots naturellement infectés sur une période de plus de 180 jours. Il aurait été intéressant de poursuivre l'étude d'excrétion virale chez les chiots de notre étude pour préciser la cinétique d'excrétion sur une période plus longue, au-delà de 56 jours.

Il apparaît ainsi que le système immunitaire du chiot pourrait ne pas contrôler le développement du coronavirus, qui peut alors être excrété en forte quantité dans l'environnement extérieur et rester une source de contamination majeure pour les nouveaux suivants dans l'élevage. Il serait alors intéressant de connaître le niveau du taux en AC anti-CPV-2 et anti-CCV au cours des semaines chez ces chiots pour pouvoir savoir si une corrélation peut être établie entre ces profils d'excrétion et les cinétiques du taux en anticorps.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'excrétion au sein de chaque portée et nous avons remarqué que pour le coronavirus ou le parvovirus, même si toutes les portées ne sont pas touchées la même semaine, l'excrétion commençait toujours sur un faible nombre de chiots puis gagnait progressivement toute la portée. En effet, concernant le parvovirus, on est passé de 4% de la portée à 52% de la portée, et pour le coronavirus de 15% à 97%. Il serait alors intéressant de savoir si le premier chiot touché dans chaque portée montrait des facteurs de risque particuliers, comme un faible poids de naissance, un déficit de transfert de l'immunité passive, ou s'il s'agissait d'un chiot fragilisé par d'autres facteurs (parasitisme, stress...). Nous n'avons pas mis en évidence d'influence de la taille de la portée alors qu'on aurait pu s'attendre à une différence puisque les chiots des portées de grande taille pourraient avoir accès à une quantité plus limitée de colostrum et donc plus à risque de déficit de transfert de l'immunité passive (Pollock et Carmichael, 1982). Il aurait été également intéressant d'étudier l'existence d'un effet mère sur l'excrétion, mais d'après Broussou (2014) les chiennes de cet élevage étaient très excrétrices en parvovirus (alors qu'elles sont correctement vaccinées), mais aucune corrélation n'a été établie entre la charge excrétée de la mère et celle des chiots.

Ainsi, les chiennes étaient une source de contamination importante pour les chiots. Nous savons que la vaccination contre CPV-2 permet la mise en place d'une immunité systémique qui permet de protéger contre le développement de signes cliniques mais pas de la contamination et donc de l'excrétion. Ainsi, il serait intéressant de connaître le taux d'anticorps anti-CPV2 et anti-CCV à la fois de la mère et des chiots de sa portée pour estimer si le transfert d'immunité passive a été convenable. De plus, nous pouvons nous demander si l'excrétion ne peut pas être influencée par le vaccin, car suivant le type de vaccin le niveau d'excrétion en parvovirus pourrait être différent. Il serait intéressant de savoir quelle charge moyenne virale on peut s'attendre à retrouver après une vaccination pour chaque souche

vaccinale, afin de choisir au mieux le protocole de vaccination et limiter la contamination des chiots.

2.3. Effet de la charge virale sur la morbidité

De fortes proportions de chiots ont présenté des signes de morbidité dans cet élevage, puisque 39% des chiots ont présenté un pic d'hyperthermie, 35% ont présenté de la diarrhée et 27% ont présenté une perte de poids, données qui sont difficiles à comparer à d'autres études puisque la plupart n'ont pas été réalisées dans un seul élevage et ont été réalisés sur des chiots expérimentalement infectés par le parvovirus ou le coronavirus. Meunier et al (1985b) ont inoculé le CPV-2 à 22 beagles et ont observé les signes chez également 30% des chiots (abattement, vomissements et diarrhée). Concernant le coronavirus, les signes cliniques semblent plus fréquents lors d'infection expérimentale : en effet, Tennant et al (1991) ont inoculé le CCV à 6 chiots de 10 semaines et 5 d'entre eux ont présenté de la diarrhée, soit 83% des chiots. En revanche, le fait de n'avoir observé des signes cliniques qu'à partir de la semaine S4 est légèrement plus précoce que les données de la littérature. En effet, si on considère que le titre en AOM reste supérieur au seuil protecteur (1:80) jusqu'à 45-52 jours (Decaro et al, 2004b, étude sur 2 portées), les répercussions cliniques devraient être plutôt localisées autour de J56.

Notre étude a également observé un effet significatif des charges en parvovirus et en coronavirus sur le score clinique : concernant le parvovirus, plus les charges excrétées augmentèrent et plus la probabilité de présenter un signe clinique augmenta, chaque signe clinique ayant la même probabilité d'apparition à charge virale égale. Ainsi, au maximum quantifiable en parvovirus, 25% des chiots pouvaient présenter chacun des signes cliniques et 60% au moins un signe, ce qui était plus important que pour le coronavirus, pour lequel ces proportions étaient respectivement 15% et 30%. Concernant les charges excrétées en coronavirus, il y a eu un effet cloche avec un nombre de chiots morbides le plus important aux charges 10^7 , ce qui n'a pas été observé dans la littérature jusqu'à présent.

C'est ainsi que seul un seuil d'excrétion pathologique en parvovirus a pu être déterminé : 10^6 copies/écouvillon. Aucune autre étude à notre connaissance n'a déterminé un seuil pathologique. Le laboratoire Scanelis, qui a analysé nos échantillons, considère que pour des chiens présentant des résultats PCR sur échantillons fécaux supérieures à 10^8 copies/écouvillon, les signes cliniques digestifs sont avec une forte probabilité imputable au parvovirus (communication personnelle).

Néanmoins, on voit que le taux de morbidité dans notre étude était important, avec de telles charges virales excrétées, et pourtant aucune mortalité sur ces 145 chiots n'a été observée, alors que par exemple dans l'étude de Godsall et al (2010) les taux de mortalité étaient respectivement de 30% pour le parvovirus et de 21,4% pour le coronavirus. En effet, on sait que la diarrhée présente chez des chiots, d'autant plus si elle est due à la présence du parvovirus, est associée à un risque de mortalité plus élevé (Grellet et al, 2012a).

Nous n'avons pas identifié que le poids à 21 jours ou la taille de la portée soit des facteurs de risque et que cela prédisposerait le chiot à excréter des charges plus importantes ou à présenter des signes de morbidité plus importants. Dans le but d'essayer de cibler en élevage les animaux à risque afin de mieux les surveiller ou de stimuler leur immunité d'une quelconque manière, il faudrait étudier d'autres facteurs de risque susceptible de montrer un effet, comme de vérifier que le transfert d'immunité passive ou la prise de poids précoce (sur les deux premiers jours de vie) soient corrects. En effet, on sait que le risque de mortalité néonatale dépend chez le chiot de ces deux facteurs : la qualité du transfert d'immunité passive, évalué par le taux d'IgG circulant à l'âge de deux jours, et la croissance entre la naissance et l'âge de deux jours (la perte de poids ne devant pas dépasser 4% du poids de naissance). On sait également qu'à l'âge de deux jours, environ 20% des chiots montrent un déficit d'immunité passive et 30% une croissance précoce insuffisante (Chastant-Maillard et Mila, 2016). Il serait alors intéressant de savoir si ces chiots sont également plus sensibles à l'excrétion virale ou à développer des signes cliniques, à la fois en période néonatale mais également pédiatrique, afin par la suite de développer des moyens de prévention pour aider ces chiots plus fragiles que les autres. D'autres facteurs comme la prise de poids quotidienne, ou la glycémie pourraient aussi être intéressants à surveiller en élevage.

2.4. Effet du format racial

Houston et al (1996) ont rapporté que les grandes races semblent plus atteintes par le parvovirus mais aucune donnée n'est disponible concernant le coronavirus. Notre étude a également montré que le format racial était un facteur de variation important sur les charges excrétées et du taux de morbidité.

2.4.1. Charge excrétée, expression clinique et format racial

Dans ce travail, le format racial exerce une influence sur l'excrétion du parvovirus en ce qui concerne le début d'excrétion et le pic d'excrétion ainsi que sur la quantité totale de coronavirus excrétée (AUC). Ainsi, les chiots de grande race ont excrété le parvovirus plus tôt avec un début d'excrétion dès J28 et J35 tandis que les chiots de petite race ont excrété plus tardivement, entre J42 et J49. De même, les chiots de grande race ont eu un pic d'excrétion plus précoce mais la charge excrétée au pic n'était pas influencée par le format racial. Enfin, sur toute la période, les chiots de grande race ont excrété une charge en coronavirus plus importante et de façon plus précoce. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que même si la prise colostrale est correcte chez les chiots de grande race, le taux d'immunoglobulines diminuerait plus rapidement et donc les virus pourraient ainsi se développer plus précocement et en plus grande quantité. On pourrait alors s'attendre à ce que le taux de morbidité chez ces chiots soit également plus élevé mais seule la perte de poids a été plus fréquente chez les chiots de grande race. Ici, le format racial n'a pas montré d'effet sur les scores globaux de morbidité, à la différence d'autres études (Jougneau, 2016) où les chiots de grande race avaient un score de morbidité digestive supérieur à celui des

chiots de petites races. Grellet et al (2012a) ont également rapporté un score fécal moins bon pour les chiots de grande race et donc une plus forte prévalence de diarrhée.

2.4.2. Hyperthermie et format racial

Nous avons également noté que pour les chiots de petites races, la fréquence de l'hyperthermie était plus importante (50% contre 38% chez les chiots de grande race). Cette différence est d'autant plus importante si on considère que les chiots de petites races ont des températures moyennes inférieures aux chiots de grande race (Catteau, 2014). En revanche, dans l'étude de Piccione et al (2010) menée chez 16 chiots de 3 races, il n'y avait pas de différence de température entre les différents formats raciaux, mais l'effectif étudié était faible (une portée de chaque race, 16 chiots au total). Ce résultat peut être corrélé au fait que les chiots de petites races excrètent des charges virales plus faibles. En effet, Meunier et al (1985b) ont démontré l'importance de la virémie du parvovirus car elle serait liée à la libération d'anticorps, souvent accompagné d'hyperthermie. Ainsi, la présence d'une hyperthermie serait le signe qu'une immunité systémique se met en place, et les chiots excréteraient alors des charges virales moindres et perdraient ainsi moins de poids. Néanmoins, les chiots de petites races n'ont pas présenté pour autant moins fréquemment de diarrhée, et ont été hospitalisés en proportion similaire dans notre étude.

2.5. Coopération entre les deux virus

Une des questions posées dans ce travail était également de savoir si lorsque les deux virus sont présents, la répercussion clinique est plus grande que lors de la présence isolée d'un seul virus. Malheureusement, dans notre étude, tous les chiots étaient co-infectés, et seuls 11 chiots ne dépassèrent pas le seuil pathologique en parvovirus malgré la circulation importante du virus dans l'environnement. Pour étudier plus précisément si une coopération entre les deux virus existe, il faudrait donc étudier un échantillon où le nombre de chiots infectés que par uniquement un des deux virus est plus important pour pouvoir réellement identifier si la combinaison des deux a des répercussions plus importantes sur les charges excrétées et les signes cliniques. Une autre possibilité serait de pratiquer une infection expérimentale sur trois groupes de chiots, un uniquement infecté par le CPV-2 et un par le CCV, avec un dernier infecté par les deux simultanément.

3. Conséquences pratiques et perspectives

Il pourrait être intéressant de génotyper les CPV-2 et CCV rencontrés dans chaque élevage pour adapter au mieux le protocole vaccinal et étudier quelle souche vaccinale serait la plus intéressante à utiliser pour limiter l'excrétion virale et donc la contamination des chiots.

Les procédures de nettoyage et de désinfection dans l'élevage étudié étaient drastiques et ciblées contre CPV-2 mais elles n'ont pas empêché la circulation du virus. 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. De plus, il ne faut pas oublier qu'il y a d'autres causes de diarrhée (bactériennes, parasites...) à prendre en compte et pouvant être des facteurs de stress ou prédisposant à ce que les deux virus étudiés se développent en de telles proportions.

De plus, il serait intéressant d'étudier plus en détail les 11 chiots qui n'ont pas excrété le parvovirus à un niveau de charge pathologique alors qu'ils ont eu un taux de morbidité relativement important, afin de savoir s'ils ont développé une immunité précoce contre le parvovirus, et ainsi la clinique observée pourrait être une conséquence de la présence du coronavirus.

Enfin, nous pouvons noter que malgré le fait que 134 chiots ont dépassé 10^6 copies/écouvillon en parvovirus, 50 chiots n'ont présenté aucun signe. Ce n'est pas la première fois que des infections asymptomatiques en parvovirus sont observées. En effet, dans une étude de Grellet et al (2012a), 12,5% des chiots excrétaient du virus sans présenter aucun signe clinique, fait rapporté également par Schmitz et al (2009) et Schulz et al (2006). Etudier pourquoi ces 50 chiots ont présenté une infection asymptomatique pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes notamment immunitaires mis en jeu lors d'une infection par le parvovirus en période pédiatrique, pour savoir si ces chiots ont des particularités concernant leur immunité systémique (AOM ou seroconversion) et/ou une immunité locale intestinale.

En effet, comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises, il serait intéressant d'étudier l'évolution du taux d'anticorps anti-CPV-2 et anti-CCV à la fois des mères, du colostrum et des chiots et voir s'il est supérieur chez les animaux asymptomatiques, comme le suggère (Meunier et al, 1985b). La valeur minimale du taux d'anticorps protecteur varie d'une étude à l'autre (1:80 pour (Pollock et Carmichael, 1982), 1:320 pour (Elia et al, 2005)) et il serait intéressant de voir où se situent les taux d'anticorps dans notre population d'étude et de voir à quelle période les chiots sous la valeur seuil réalisent leur séroconversion. En effet, (Mila et al, 2014b) a observé, pour les chiots sous le seuil à la naissance, une séroconversion que au-delà de J42. De plus, étudier le taux en copro-immunoglobulines, notamment en IgA, d'origine endogène ou apporté par le lait maternel qui en est riche, pourrait contribuer à comprendre leur rôle à protéger la muqueuse intestinale et inhiber l'adhérence de pathogènes (Rice et al, 1982). Il a été observé par (Grellet et al, 2012b) que le taux d'IgA fécal était supérieur chez les chiots de 4 à 6 semaines par rapport aux chiots de 7 à 9 semaines, ce qui pourrait expliquer pourquoi dans notre

étude les signes cliniques et les charges excrétées augmentent au cours du temps, et sont particulièrement importantes sur les deux dernières semaines de l'étude, soit la 7ème et 8ème semaine.

CONCLUSION

Les diarrhées de sevrage constituent un processus complexe résultant de l'interaction de différents facteurs, certains propres à l'animal, d'autres environnementaux comme la présence d'entéropathogènes tel que le parvovirus ou le coronavirus. Concernant les facteurs propres à l'animal, nous avons vu que l'âge est un paramètre essentiel, puisque l'excrétion virale et les répercussions sont de plus en plus importantes avec l'âge. Le format racial est également important puisque les chiots de grande race semblent plus fragiles, excréant des charges virales plus précocement, de façon plus importante et développent des signes cliniques plus marqués.

La compréhension des entéropathogènes circulant en élevage est également primordiale pour pouvoir garantir à terme une sécurité digestive aux chiots. En effet, nous avons vu que le parvovirus et le coronavirus sont des virus ayant des mécanismes d'action et d'excrétion différents, le CPV-2 n'étant excrété que durant un pic d'excrétion et le CCV restant excrété sur un plateau durant plusieurs semaines. Trouver les mécanismes de protection des chiots en élevage serait alors une perspective d'étude intéressante et prometteuse pour détecter précocement les chiots plus à risque, et apprendre comment l'éleveur peut contribuer à mieux les immuniser.

Enfin, de nombreux autres pathogènes sont impliqués dans les diarrhées de sevrage, avec de nouveaux entéropathogènes régulièrement identifiés chez le chiot comme les astrovirus, les norovirus ou les trichomonadidés.... Il faudrait donc peut-être tenir compte de ces co-infections dans un sens plus large.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussignée, Sylvie CHASANT-MAILLARD, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **HANSE Barbara** intitulée « **Excrétion fécale du parvovirus et du coronavirus chez le chiot : cinétique d'excrétion et expression clinique lors de co-infection spontanée.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

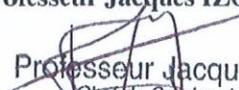
Fait à Toulouse, le 18 novembre 2016
Professeur Sylvie CHASANT-MAILLARD
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITTELLIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jacques IZOPET


Professeur Jacques IZOPET
Chef de Service de Virologie
Plateau Technique d'Infectiologie
Institut Fédératif de Biologie
330, avenue de Grande-Bretagne
TSA 40031 - 31059 TOULOUSE Cedex 9
M. 05 67 94 39 20 Fax 05 67 69 04 25
a été admis(e) sur concours en : 2011
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015
a validé son année d'approfondissement le : 13/07/2016
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL
Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU


Régine ANDRE-OBRECHT



BIBLIOGRAPHIE

APPEL MJG, COOPER BJ, GREISEN H, SCOTT F, CARMICHAEL LE (1979). Canine viral enteritis i: status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *The Cornell Veterinarian*, **69**, p. 123–133.

APPEL MJG (1987). Canine coronavirus. In: *Virus infections of carnivores*, Elsevier Science Publishers, The Netherlands, p. 115–122.

APPEL MJG (1988). Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection ? *Veterinary Medecine* April 1988, p. 360-366.

AMROUCHE T (2005). *Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués*. Thèse de doctorat en sciences et technologie des aliments. Université De Laval, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation.

BARKER IK, PARRISH CR (2001). Chapitre 6 : Parvovirus infections, In: *Williams E, Barker I, Infectious Diseases Of Wild Mammals*, 3^e édition, Blackwell Edition.

BROUSSOU D (2014). *Etude de l'excrétion du parvovirus canin CPV-2 par la chienne pendant la gestation et la lactation*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse 3, 61 p.

BROUSSOU D, MILA H, GRELLET A, FEUGIER A, MARIANI C, BOUCRAUT-BARALON C, CHASTANT-MAILLARD S (2015). *Excretion of canine parvovirus type 2 (CPV2) during gestation and lactation in bitches: a prospective study in a French Breeding kennel*. ECVIM (European Congress of Veterinary Internal Medicine) 10-12 Septembre 2015. Lisbonne, Portugal.

BUONAVOGLIA C, TOLLIS M, BUONAVOGLIA D, PUCCINI A (1992). Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **15**, p. 281–283.

BUONAVOGLIA, C, DECARO N, MARTELLA V, ELIA G, CAMPOLO M, DESARIO C, CASTAGNARO M, TEMPESTA M (2006). Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerging Infectious Diseases*, **12**, p. 492–494.

BURTONBOY S, CHARLIER P, HERTOOGHS J, LOBMANN M, WISEMAN A, WOODS S (1991). Performance of high titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody. *Veterinary Record*, **128**, p. 377–381.

CATTEAU M (2014). *Température du chiot en période néonatale et pédiatrique : mesure, variation, intérêt pronostique*, Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse 3, 59p.

CAVALLI A, MARTELLA V, DESARIO C, CAMERO M, BELLACICCO AL, DE PALO P, DECARO N, ELIA G, BUONAVOGLIA C (2008). Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clinical and Vaccine Immunology*, **15**, p. 534-539.

CHASTANT-MAILLARD S, MARCHETEAU E, FREYBURGER L, FONTBONNE A, BERGAMO P, RAVIER JF, REYNAUD K (2010). Identification and quantification of immunoglobulins in canine colostrum – Quantification of colostral transfer. In: *7e EVSSAR Congress (European Veterinary Society for Small Animal Reproduction)* (p. 107). Présenté à 7e EVSSAR Congress (European Veterinary Society for Small Animal Reproduction), Louvain, Belgique.

CHASTANT-MAILLARD S, FREYBURGER L, MARCHETEAU E, THOUMIRE S, RAVIER JF, REYNAUD K (2012). Timing of the intestinal barrier closure in puppies, *Reproduction in Domestic Animals*, **47**, p. 190–193.

CHASTANT-MAILLARD S, MILA H (2016). Le colostrum de la chienne, *Veterinary Focus*, **26**, p. 32-38.

DAY MJ, HORZINEK MC, SCHULTZ RD (2007), Vaccination Guidelines Group (VGG) Of The World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). In : *Guidelines for the vaccination of dogs and cats, compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA)*. *Journal of Small Animal Practice*, **48**, p. 528–41.

DECARO N, PRATELLI A, TINELLI A, MARTELLA V, CAMERO M, BUONAVOGLIA D, TEMPESTA M, CAROLI AM, BUONAVOGLIA C (2004a). Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **11**, p. 102-105.

DECARO N, DESARIO C, CAMPOLO M, CAVALLI A, RICCI D, MARTELLA V, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C (2004b). Evaluation of lactogenic immunity to canine parvovirus in pups. *New Microbiology*, **27**, p. 375-379.

DECARO N, MARTELLA V, RICCI D, ELIA G, DESARIO C, CAMPOLO M, CAVALIERE N, DI TRANI L, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C (2005a). Genotype-specific fluorogenic RT PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *Journal of Virological Methods*, **130**, p. 72–78.

DECARO N, DESARIO C, CAMPOLO M, ELIA G, MARTELLA V, RICCI D, LORUSSO E, BUONAVOGLIA C (2005b). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 glu-426 mutant. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **17**, p. 133–138.

DECARO N, BUONAVOGLIA C (2008a). An update on canine coronaviruses : viral evolution and pathobiology. *Veterinary Microbiology*, **132**, p. 221–234.

DECARO N, CAMPOLO M, LORUSSO A, DESARIO C, MARI V, COLAIANNI ML, ELIA G, MARTELLA V, BUONAVOGLIA C (2008b). Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. *Veterinary Microbiology*, **128**, p. 253–260.

DECARO N, MARI V, ELIA G, ADDIE DD, CAMERO M, LUCENTE MS, MARTELLA V, BUONAVOGLIA C (2010). Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **16**, p. 41–47.

DECARO N, BUONAVOGLIA C (2011a). Canine coronavirus : not only an enteric pathogen. *Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice*, **41**, p. 1121–1132.

DECARO N, MARI V, SCIARRETTA R, COLAO V, LOSURDO M, CATELLA C, ELIA G, MARTELLA V, DEL GIUDICE G, BUONAVOGLIA C (2011b). Immunogenicity and protective efficacy in dogs of an MF59TM-adjuvanted vaccine against recombinant canine/porcine coronavirus. *Vaccine*, **29**, p. 2018–2023.

DECARO N, BUONAVOGLIA C (2012). Canine parvovirus : a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*, **155**, p. 1-12.

DECARO N (2016). Le parvovirus canin, *Veterinary Focus*, **26**, p. 39-44.

DE CASTRO CC, JOHANN LM, FINGER PF, NUNES CF, VARGAS GD, FISCHER G, HÜBNER SO (2010). Canine coronavirus (CCoV) in dogs vaccinated and unvaccinated domiciliated in Pelotas, RS, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, **31**, p. 995-1000.

DELSARTE (2009). *Actualités thérapeutiques et propositions de facteurs pronostiques pour la parvovirose canine : synthèse bibliographique et étude rétrospective de 33 cas du service de soins intensifs de l'ENV Lyon (SIAMU)*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, p. 22-58.

ELIA G, CAVALLI A, CIRONE F, LORUSSO E, CAMERO M, BUONAVOGLIA D, TEMPESTA M (2005). Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, **52**, p. 320–322.

ENJUANES L, BRIAN D, CAVANAGH D, HOLMES K, LAI MMC, LAUDE H, MASTERS P, ROTTIER P, SIDDELL S, SPAAN WJM, TAGUCHI F, TALBOT P (2000). Family Coronaviridae In: *Virus Taxonomy, Classification And Nomenclature Of Viruses*. Academic Press, New York, p. 835–849.

ETTINGER SJ, FELDMAN EC (2009). Canine Parvovirus In : *Textbook Of Veterinary Internal Medicine Expert Consult, 7th Edition, Vol 2*. Elsevier Saunders, Saint-Louis, p. 1007-1009.

EVERMANN JF, ABBOTT JR, HAN S (2005). Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **17**, p. 610–614.

FIELDS B, KNIPE D, HOWLEY P (2007). *Fields' Virology*. 5e Edition Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6060-7.

GEBAUER F, POSTHUMUS WP, CORREA I, SUÑE C, SMERDOU C, SANCHEZ CM, LENSTRA JA, MELOEN RH, ENJUANES L (1991). Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein. *Virology*, **183**, p. 225-238.

GLOVER S, ANDERSON C, PIONTKOWSKI M, NG T (2012). Canine parvovirus (CPV) type 2b vaccine protects puppies with maternal antibodies to CPV when challenged with CPV-2c virus. *The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, **10**, p. 217.

GODDARD A, LEISEWITZ AL (2010). Canine Parvovirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **40**, p. 1041–1053.

GODSALL SA, CLEGG SR, STAVISKY JH, RADFORD AD, PINCHBECK G (2010). Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA Petaid Hospitals. *Veterinary Record*, **167**, p. 196-201.

GRELLET A, FEUGIER A, CHASTANT-MAILLARD S, CARREZ B, BOUCRAUT-BARALON C, CASSELEUX G, GRANDJEAN D (2012a). Validation of a fecal scoring scale in puppies during the weaning period. *Preventive Veterinary Medicine*, **106**, p. 315–323.

GRELLET A (2012b). Evaluation de la santé digestive du chiot en élevage : facteurs de risque des diarrhées. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 219p.

GRELLET A, CHASTANT-MAILLARD S, ROBIN C, FEUGIER A, BOOGAERTS C, BOUCRAUT-BARALON C, GRANDJEAN D, POLACK B (2014). Risk factors of weaning diarrhea in puppies housed inbreeding kennels. *Preventive Veterinary Medicine*, **117**, p. 260–265.

HOUSTON DM, RIBBLE CS, HEAD LL (1996). Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *Journal of The American Veterinary Medical Association*, **208**, p. 542-546.

HIRASAWA T, IWAKI S, WATANABE K, MIKAZUKI K, MAKINO S, HAYASHI Y (1987). Outbreak of canine parvovirus infection and its elimination in a closed beagle dog colony. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, **34**, p. 598-606.

JOUGNEAU S (2016). *Impact d'une supplémentation tardive en immunoglobulines sur la croissance, la température, la morbidité et la mortalité pédiatrique chez le chiot*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Toulouse 3, 76p.

KALLI I, LEONTIDES LS, MYLONAKIS ME, ADAMAMA-MORAITOU K, RALLIS T, KOUTINAS AF (2010). Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Research in Veterinary Science*, **89**, p. 174–178.

KEENAN KP, JERVIS HR, MARCHWICKI RH, BINN LN (1976). Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1–71 : studies by virologic, histologic, histochemical, and immunofluorescent techniques. *American Journal of Veterinary Research*, **37**, p. 247–256.

LICITRA BN, DUHAMEL GE, WHITTAKER GR (2014). Canine enteric coronaviruses : emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. *Viruses*, **6**, p. 3363-3376.

LIDA H, FUKUDA S, KAWASHIMA N, YAMAZAKI T, AOKI J, TOKITA K, MORIOKA K, TAKARADA N, SOEDA T (1990). Effect of maternally derived antibody levels on antibody responses to canine parvovirus, canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus after vaccinations in beagle puppies. *Jikken Dobutsu*, **39**, p. 9–19.

MACARTNEY L, MCCANDLISH IAP, THOMPSON H, CORNWELL HJC (1984). Canine parvovirus enteritis 1: clinical, haematological and pathological features of experimental infection. *Veterinary Record*, **115**, p. 201–210.

MACARTNEY L, THOMPSON H, MCCANDLISH IA, CORNWELL HJ (1988). Canine parvovirus : interaction between passive immunity and virulent challenge. *Veterinary Record*, **122**, p. 573–576.

MARTELLA V, DECARO N, ELIA G, BUONAVOGLIA C (2005a). Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, **52**, p. 312-315.

MARTELLA V, CAVALLI A, DECARO N, ELIA G, DESARIO C, CAMPOLO M, BOZZO G, TARSITANO E, BUONAVOGLIA C (2005b). Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12**, p. 1243-1245.

MEUNIER PC, COOPER BJ, APPEL MJ, LANIEU ME, SLAUSON DO (1985a). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Veterinary Pathology*, **22**, p. 617-624.

MEUNIER PC, COOPER BJ, APPEL MJ, SLAUSON DO (1985b). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Veterinary Pathology*, **22**, p. 60-71.

MILA H, GRELLET A, DESARIO C, FEUGIER A, DECARO N, BUONAVOGLIA C, CHASTANT-MAILLARD S (2014a). Protection against canine parvovirus type 2 infection in puppies by colostrum-derived antibodies. *Journal of Nutritional Science* (2014), Vol. 3, eCollection54.

MILA H, FEUGIER A, GRELLET A, ANNE J, GONNIER M, MARTIN M, ROSSIG L, CHASTANT-MAILLARD S (2014b). Inadequate passive immune transfer in puppies: definition, risk factors and prevention in a large multi-breed kennel. *Preventive Veterinary Medicine*, **116**, p. 209–213.

MIRANDA C, CARVALHEIRA J, PARRISH CR, THOMPSON G (2015). Factors affecting the occurrence of canine parvovirus in dogs. *Veterinary Microbiology*, **80**, p. 59-64.

NARA PL, WINTERS K, RICE JB, OLSEN RG, KRAKOWKA S (1983). Systemic and local intestinal antibody response in dogs given both infective and inactivated canine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, **44**, p. 1989-1995.

NTAFIS V, MARI V, DANIKA S, FRAGKIADAKI E, BUONAVOGLIA C (2010). An outbreak of canine coronavirus in puppies in a greek kennel. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **22**, p. 320–323.

PARRISH CR, OLIVER RE, MCNIVEN R (1982). Canine parvovirus infection in a colony of dogs. *Veterinary Microbiology*, **7**, p. 317–324.

PETIT A (2010). *Evolution du parvovirus canin et conséquences sur le diagnostic et la prophylaxie médicale: étude bibliographique*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Maisons Alfort ENVA, 165p.

PICCIONE G, GIUDICE E, FAZIO F, MORTOLA JP (2010). The daily rhythm of body temperature, heart and respiratory rate in newborn dogs. *Journal of Comparative Physiology B*, **180**, p. 895–904.

POLLOCK RV, CARMICHAEL LE (1982a). Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **180**, p. 37–42.

POLLOCK RV (1982b). Experimental canine parvovirus infection in dogs. *The Cornell Veterinarian*, **72**, p. 103–119.

POLLOCK RV, COYNE MJ (1993). Canine Parvovirus. *Veterinary Clinics Of North America, Small Animal Practice*, **23**, p. 555–568.

POTGIETER LN, JONES JB, PATTON CS, AND WEBB-MARTIN TA (1981). Experimental Parvovirus Infection In Dogs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **45**, p. 212-216.

PRATELLI A, TEMPESTA M, ROPERTO FP, SAGAZIO P, CARMICHAEL L, BUONAVOGLIA C (1999). Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **11**, p. 550–553.

PRATELLI A, MARTELLA V, ELIA G, TEMPESTA M, GUARDA F, CAPUCCHIO MT, CARMICHAEL LE, BUONAVOGLIA C (2001). Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infection by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, **48**, p. 385–392.

PRATELLI A, MARTELLA V, PISTELLO M, ELIA G, DECARO N, BUONAVOGLIA D, CAMERO M, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C (2003a). Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *Journal of Virological Methods*, **107**, p. 213–222.

PRATELLI A, MARTELLA V, DECARO N, TINELLI A, CAMERO M, CIRONE F, ELIA G, CAVALLI A, CORRENTE M, GRECO G, BUONAVOGLIA D, GENTILE M, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C (2003b). Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhea in Italy. *Journal of Virology Methods*, **110**, p. 9-17.

PRATELLI A, DECARO N, TINELLI A, MARTELLA V, ELIA G, TEMPESTA M, CIRONE F, BUONAVOGLIA C (2004a). Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the faecal samples of dogs with diarrhoea. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, p. 1797–1799.

PRATELLI A, TINELLI A, DECARO N, MARTELLA V, CAMERO M, TEMPESTA M, MARTINI M, CARMICHAEL LE, BUONAVOGLIA C (2004b). Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs. *Veterinary Microbiology*, **99**, p. 43–49.

PRATELLI A (2006). Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Veterinary Research*, **37**, p. 191–200.

RICE JB, WINTERS KA, KRAKOWKA S, OLSEN RG (1982). Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirus gastroenteritis. *Infection and immunity*, **38**, p. 1003-1009.

RUGGIERI A, DI TRANI L, GATTO I, FRANCO M, VIGNOLO E, BEDINI B, ELIA G, BUONAVOGLIA C (2007). Canine coronavirus induces apoptosis in cultured cells. *Veterinary Microbiology*, **121**, p. 64–72.

SCHMITZ S, COENEN C, KÖNIG M, THIEL HJ, NEIGER R (2009). Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **21**, p. 344–345.

SCHULZ BS, STRAUCH C, TRUYEN U, HARTMAN K (2006). Prevalence of enteral viruses in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea and in healthy dogs. Proceedings of the British Small Animal Veterinary Association Congress. Birmingham, 20-23 Avril 2006. p. 572.

TENNANT BJ, GASKELL RM, KELLY DF, CARTER SD, GASKELL CJ (1991). Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Research In Veterinary Science*, **51**, p. 11-18.

THIERY EN, *Maladies virales du chien : cours de pathologie des maladies virales vétérinaires chapitre 7*, Université De Liège [en ligne]. Disponible sur <http://www.dmipfmv.ulg.ac.be/virovet/m/canin/canin-digestif.pdf> (consulté le 03/03/2016).

VAN NGUYEN S, UMEDA K, YOKOYAMA H, TOHYA Y (2006). Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **70**, p. 62.

WELLS DL, HEPPER PG (1999). Prevalence of disease in dogs purchased from an animal rescue shelter. *Veterinary Record*, **144**, p. 35–38.

WOODS RD, WESLEY RD, KAPKE PA (1987). Complement dependent neutralization of transmissible gastroenteritis virus by monoclonal antibodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **218**, p. 493–500.

ZICOLA A, JOLLY S, MATHIJS E, ZIANT D, DECARO N, MARI V, THIRY E (2012). Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *Journal Of Small Animal Practice*, **53**, p. 297–300.

Nom : HANSE

Prénom : Barbara

TITRE : Excrétion fécale du parvovirus et du coronavirus chez le chiot : cinétique d'excrétion et expression clinique lors de co-infection spontanée

RESUME : Les diarrhées de sevrage constituent un processus complexe en élevage canin, résultant de l'interaction de différents facteurs, comme la présence d'entéropathogènes tel que le parvovirus CPV-2 ou le coronavirus CCV. Notre étude, réalisée sur 145 chiots de 6 races différentes dans un élevage, s'est intéressée à une co-infection spontanée de ces deux pathogènes et a évalué l'excrétion virale fécale mesurée par PCR sur écouvillon rectal, et les répercussions cliniques. La cinétique d'excrétion du parvovirus et du coronavirus s'est révélée différente, le CPV-2 n'étant excrété que durant un pic d'excrétion et le CCV restant excrété sur un plateau de plusieurs semaines. Le taux de morbidité est lié à la charge virale excrétée des deux virus, avec un seuil d'excrétion pathologique en parvovirus à 10^6 copies/écouvillon. Les chiots de grande race excrètent les virus en quantité plus importantes et ont un taux de morbidité supérieur. L'impact du déficit immunitaire systémique et de l'immunité digestive sur la charge excrétée et l'expression clinique pourrait alors être intéressant à étudier.

MOTS-CLES : parvovirus/ coronavirus/ chiot/ excrétion fécale/ morbidité/ immunité

TITLE : Fecal shedding of parvovirus and coronavirus in puppies : shedding kinetic and morbidity on a spontaneous co-infection

ABSTRACT : Fecal changes in puppies weaning are frequent and can be the result of many factors, such as signs of infection by digestive pathogens viruses : canine parvovirus CPV-2 or coronavirus CCV. The aim of our study, conducted on 145 puppies from 6 different breeds, was to study a co-infection of these two pathogens through the fecal shedding, checked by quantitative PCR on fecal samples, and clinical impact. Viruses shedding kinetic was different for the two viruses, parvovirus shedded just on a peak around one week whereas coronavirus was still shedded after several weeks. Morbidity rate was correlated to fecal shedding and a shedding of 10^6 copy/sample was revealed as pathologic. Shedding of puppies of large breeds was more important and they had an high morbidity rate. Find and improve immunity of deficient puppies could be studied to improve puppies health in breeding kennels.

KEYWORDS : canine parvovirus/ canine coronavirus/ puppies/ fecal shedding/ morbidity/ immunity