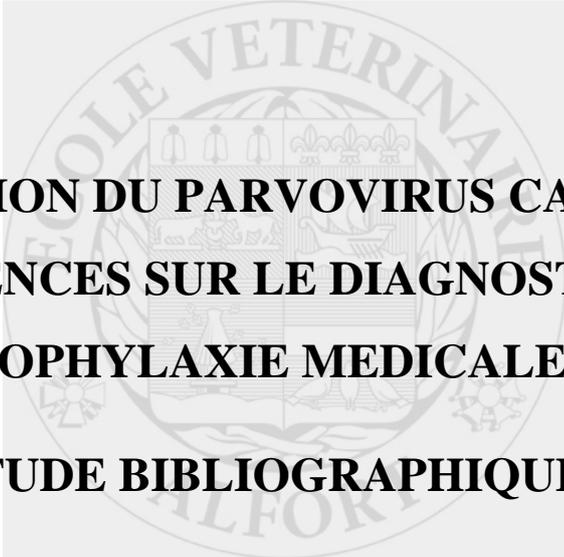


Année 2010



**EVOLUTION DU PARVOVIRUS CANIN ET  
CONSEQUENCES SUR LE DIAGNOSTIC ET LA  
PROPHYLAXIE MEDICALE :  
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

par

**Amandine PETIT**

Née le 3 Janvier 1986 à Vichy (Allier)

JURY

**Président :**

**Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL**

**Membres**

**Directeur : Mme Sophie LE PODER**

**Maître de conférences de Virologie à l'ENVA**

**Assesseur : Mr Henri-Jean BOULOUIS**

**Professeur de Microbiologie à l'ENVA**



**LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT**

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires : MM. BRUGERE Henri, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François  
LE BARS Henri, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques,

**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

|   |  |
|---|--|
| <p><b>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b><br/>Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur<br/>M. DEGUEURCE Christophe, Professeur<br/>Mme ROBERT Céline, Maître de conférences<br/>M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b><br/>Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur*<br/>M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur<br/>M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b><br/>Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur*<br/>M. TIRET Laurent, Maître de conférences<br/>Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b><br/>Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur<br/>M. TISSIER Renaud, Maître de conférences*<br/>M. FERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b><br/>M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> | <p><b>- UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b><br/>M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur *<br/>Mme BERNEX Florence, Maître de conférences<br/>Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences<br/>M. REYES GOMEZ Edouard, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE VIROLOGIE</b><br/>M. ELOIT Marc, Professeur *<br/>Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b><br/>M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur<br/>Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE BIOCHIMIE</b><br/>M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences*<br/>M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : ANGLAIS</b><br/>Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p><b>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</b><br/>M. PHILIPS, Professeur certifié</p> |
|---|--|

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

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

|   |  |
|---|--|
| <p><b>- UNITE DE MEDECINE</b><br/>M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur*<br/>Mme CHETBOUL Valérie, Professeur<br/>M. BLOT Stéphane, Professeur<br/>M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences<br/>Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences<br/>Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b><br/>M. DENOIX Jean-Marie, Professeur<br/>M. AUDIGIE Fabrice, Professeur*<br/>Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier<br/>Mlle CHRISTMANN Undine, Maître de conférences<br/>Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel<br/>Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel<br/>M. CARNICER David, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b><br/>Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Professeur (rattachée au DPASP)<br/>M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences<br/>M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences*<br/>M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)<br/>M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences<br/>Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP)<br/>Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p> <p><b>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS</b><br/>Mme Françoise ROUX, Maître de conférences</p> | <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b><br/>M. FAYOLLE Pascal, Professeur *<br/>M. MOISSONNIER Pierre, Professeur<br/>M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences<br/>M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel<br/>Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences<br/>Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP)<br/>M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences<br/>M. JARDEL Nicolas, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE</b><br/>Mme BEGON Dominique, Professeur*<br/>Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p><b>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b><br/>Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b><br/>M. CHERMETTE René, Professeur *<br/>M. POLACK Bruno, Maître de conférences<br/>M. GUILLOT Jacques, Professeur<br/>Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences<br/>Mme HALOS Lénia, Maître de conférences (rattachée au DPASP)<br/>M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT</b><br/>M. GRANDJEAN Dominique, Professeur *<br/>Mme YAGUYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION</b><br/>M. PARAGON Bernard, Professeur</p> |
|---|--|

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

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

|   |  |
|---|--|
| <p><b>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b><br/>M. BENET Jean-Jacques, Professeur*<br/>Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Professeur<br/>Mme DUFOUR Barbara, Professeur<br/>Melle PRAUD Anne, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b><br/>M. BOLNOT François, Maître de conférences *<br/>M. CARLIER Vincent, Professeur<br/>Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences<br/>M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : BIostatISTIQUES</b><br/>M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences contractuel</p> | <p><b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b><br/>M. COURREAU Jean-François, Professeur<br/>M. BOSSE Philippe, Professeur<br/>Mme GRMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur<br/>Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences<br/>M. ARNE Pascal, Maître de conférences<br/>M. PONTER Andrew, Professeur*</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b><br/>M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences *<br/>Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP)<br/>M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences<br/>M. ADJOU Karim, Maître de conférences<br/>M. BELBIS Guillaume, Maître de conférences contractuel</p> |
|---|--|

\* Responsable de l'Unité



# REMERCIEMENTS

Au Président du jury,

Professeur de la faculté de Médecine de Créteil,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse.

Hommage respectueux.

A Madame le Docteur LE PODER,

Maître de conférence de Virologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a accepté de diriger cette thèse, pour m'avoir permis de mener à bien ce travail, pour ses explications et ses conseils au long de mon parcours, pour sa disponibilité.

Mes plus sincères remerciements et toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur BOULOUIS,

Professeur de Microbiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a accepté d'être assesseur du jury de thèse et pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Mes sincères remerciements.

A toute l'équipe de la bibliothèque de l'ENVA,

Pour leur disponibilité et leur aide.

Toute ma reconnaissance.

A toute l'équipe de la Scolarité de l'ENVA,  
Pour leur disponibilité et leurs conseils.  
Sincères remerciements.

A toute l'équipe des professeurs de l'ENVA,  
Pour leur enseignement.  
Toute ma reconnaissance.

A ma famille,  
Pour m'avoir toujours soutenue dans toutes mes entreprises et m'avoir permis de  
faire mes études dans les meilleures conditions, pour leur aide, pour la confiance et  
l'affection dont ils ont toujours fait preuve.  
Toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mes amis alforiens et bressans  
Pour tous ces moments partagés, pour leur présence et leur soutien.  
Avec toute mon amitié.

# **EVOLUTION DU PARVOVIRUS CANIN ET CONSEQUENCES SUR LE DIAGNOSTIC ET LA PROPHYLAXIE MEDICALE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

**Auteur :** PETIT Amandine

## **Résumé :**

Les Parvovirus sont présents chez différentes espèces animales et ont une capacité d'évolution génétique exceptionnelle. Le parvovirus canin, CPV-2, est un agent pathogène viral majeur ayant émergé à la fin des années 1970. Il est à l'origine d'une maladie infectieuse souvent mortelle qui circule actuellement de façon endémique dans les populations canines du monde entier. Trois souches de ce virus à ADN monocaténaire, CPV-2, 2a et 2b, se sont succédées dans les populations canines et une nouvelle souche, CPV-2c, se répand depuis l'an 2000, sur la planète chez le chien, le chat et certaines espèces sauvages. L'étude de la phylogénie et des mutations à l'origine des nouvelles souches permet d'expliquer l'évolution de la clinique et amène à développer de nouvelles méthodes diagnostic comme la RFLP ou les tests rapides, ainsi que de nouvelles stratégies prophylactiques. En effet, malgré une vaccination souvent respectée, la parvovirose reste une maladie fréquente et mortelle. De nouveaux vaccins associés à des mesures sanitaires rigoureuses tentent d'aider à enrayer la diffusion de ce virus. Il reste cependant indispensable de surveiller l'évolution de ce virus pour anticiper les risques de panzootie dans d'autres espèces domestiques et sauvages.

**Mots clés :** PARVOVIRUS CANIN – CPV-2c – MALADIE VIRALE – PHYLOGENIE – MUTATION – EPIDEMIOLOGIE – PROPHYLAXIE – DIAGNOSTIC – CARNIVORE – CHIEN – CHAT – FELIDE

## **Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Dr. Sophie LE PODER

Assesseur : Pr. Henri-Jean BOULOUIS

## **Adresse de l'auteur :**

Amandine PETIT

380 chemin de la soupe 01240 CERTINES

# **CANIN PARVOVIRUS EVOLUTION AND CONSEQUENCES ON DIAGNOSTIC AND MEDICAL PROPHYLAXY:**

## **BIBLIOGRAPHIC STUDY**

**Author :** PETIT Amandine

### **Summary :**

Parvovirus can be found in many animal species and they have got an exceptional genetic capacity of evolution. Canine parvovirus , CPV-2, is a major viral pathogen agent which appeared in the late 1970's. He is responsible of a lethal disease which currently spreads, nowadays, as an endemic way in all the canine population in the world. Three strains of this single-stranded ADN virus, CPV-2, 2a and 2b, have already affected canine populations and a new strain, CPV-2c, is currently circulating since 2000 in dogs, cats and some wild species in the entire world. Studies of phylogeny and mutations responsible of the new strains allow to explain the clinic evolution and lead to develop new diagnosis methods, as RFLP, quick tests and new prophylactic strategies. Indeed, in spite of the respect of vaccination protocol, the disease remains frequent and fatal. New vaccines associated with rigorous sanitary measures try to help to stop the virus propagation. Furthermore, it remains essential to look after virus evolution in order to anticipate panzootic risks in other domestic and wild species.

**Keywords :** CANINE PARVOVIRUS – CPV-2c – VIRAL DISEASE – PHYLOGENY – MUTATION – PROPHYLAXY – DIAGNOSISI – EPIDEMIOLOGY – CARNIVORE – DOG – CAT – FELID .

### **Jury :**

President : Pr.

Director : Dr. Sophie LE PODER

Assessor : Pr. Henry-Jean BOULOUIS

### **Author's address:**

Amandine PETIT

380 chemin de la soupe 01240 CERTINES



# TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| LISTE DES FIGURES.....   | 7  |
| LISTE DES TABLEAUX .....   | 11 |
| INTRODUCTION.....  | 13 |
| PREMIERE PARTIE:.....  | 15 |
| Présentation du Parvovirus canin et Epidémiologie des différents sous-types viraux |    |
| I. HISTORIQUE.....   | 17 |
| 1. Découverte du parvovirus canin .....  | 17 |
| 2. Découverte des sous types CPV-2a et CPV-2b .....                                | 19 |
| 3. Découverte du sous-type 2c .....  | 20 |
| 4. Législation.....  | 22 |
| II. PRESENTATION DE L'AGENT PATHOGENE .....  | 23 |
| 1. Classification.....   | 23 |
| 2. Morphologie et structure.....   | 24 |
| a. Morphologie :.....  | 24 |
| b. Organisation génomique : .....  | 27 |
| 3. Caractères physico-chimiques.....   | 28 |
| 4. Le cycle viral.....   | 29 |
| 5. Mécanismes de l'immunité face au parvovirus canin.....                          | 33 |
| 6. Principales différences avec les autres Parvovirus .....                        | 34 |
| III. EVOLUTION MOLECULAIRE DES SOUS-TYPES.....                                     | 37 |
| 1. Mutations à l'origine des différents sous-types .....                           | 37 |
| a. De FPV à CPV-2.....   | 37 |
| i. Les mutations .....   | 37 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| ii. | Phylogénie.....  | 39 |
| b.  | De CPV-2 à CPV-2a/2b .....                                     | 41 |
| i.  | Les mutations .....  | 41 |
| ii. | Phylogénie.....  | 43 |
| c.  | Apparition de CPV-2c.....                                      | 44 |
| 2.  | Caractéristiques moléculaires spécifiques au sous-type 2c..... | 49 |
| IV. | EPIDEMIOLOGIE DU PARVOVIRUS CANIN ET DE SES SOUS-TYPES.....    | 51 |
| 1.  | Répartition mondiale.....                                      | 51 |
| a.  | Dans le monde.....   | 51 |
| b.  | En Europe.....   | 53 |
| c.  | En France .....  | 55 |
| 2.  | Epidémiologie du parvovirus canin .....                        | 56 |
| a.  | Source de contamination.....                                   | 56 |
| b.  | Transmission .....   | 57 |
| c.  | Sensibilité des espèces .....                                  | 59 |
| d.  | Voies de pénétration: .....                                    | 60 |
| e.  | Réceptivité .....  | 60 |
| f.  | Morbidité et mortalité .....                                   | 62 |
| 3.  | Particularité épidémiologique de CPV-2c.....                   | 62 |
| a.  | Transmission .....   | 62 |
| b.  | Réceptivité .....  | 63 |
| c.  | Infectiosité.....  | 63 |
| d.  | Morbidité et mortalité .....                                   | 63 |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| DEUXIEME PARTIE:..... | 65 |
|-----------------------|----|

Physiopathogénie et méthodes de diagnostic des différentes souches du Parvovirus canin

|    |  |    |
|----|--|----|
| I. | PATHOGENICITE ET FORMES CLINIQUES..... | 67 |
| 1. | Physiopathogénie .....                 | 67 |
| a. | Etapas de l'infection.....             | 67 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| b.   | La virémie .....  | 68 |
| 2.   | Les symptômes.....  | 70 |
| a.   | Forme entérique .....   | 70 |
| i.   | Évolution clinique.....   | 70 |
| ii.  | Modifications hématologiques.....   | 72 |
| iii. | Symptômes particuliers chez le chat.....  | 74 |
| b.   | Forme cardiaque.....  | 75 |
| 3.   | Comparaison de la pathogénicité des souches .....                                       | 76 |
| a.   | Chez le chien.....  | 76 |
| b.   | Chez le chat.....   | 77 |
| II.  | LES LESIONS .....   | 79 |
| 1.   | Macroscopiques .....  | 79 |
| 2.   | Microscopiques .....  | 81 |
| III. | METHODES DIAGNOSTIC .....   | 83 |
| 1.   | Diagnostic Clinique.....  | 83 |
| 2.   | Diagnostic Différentiel.....  | 83 |
| 3.   | Examens complémentaires.....  | 84 |
| a.   | Prélèvements .....  | 84 |
| b.   | Diagnostic direct .....   | 84 |
| i.   | Observation du virus par microscopie électronique.....                                  | 85 |
| ii.  | RFLP, ou PCR basée sur le polymorphisme de la taille des fragments de restriction... 86 |    |
| iii. | La Polymérisation en chaîne ou PCR .....  | 89 |
| A.   | Les prélèvements.....   | 89 |
| B.   | Principe .....  | 89 |
| C.   | Etapas de la PCR.....   | 90 |
| D.   | Les différentes techniques PCR.....   | 93 |
| E.   | Le séquençage .....   | 94 |
| F.   | Intérêts.....   | 94 |
| G.   | Limites .....   | 95 |
| iv.  | Hémagglutination.....   | 96 |
| A.   | Principe .....  | 96 |
| B.   | Intérêt .....   | 97 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| C.    | Limites .....   | 97  |
| v.    | Mise en évidence du virus sur culture cellulaire..... | 98  |
| A.    | Principe .....  | 98  |
| B.    | Intérêt .....   | 98  |
| C.    | Limites .....   | 98  |
| vi.   | Méthode ELISA .....                                   | 99  |
| A.    | Principe .....  | 99  |
| B.    | Intérêt .....   | 100 |
| C.    | Limites .....   | 101 |
| vii.  | Immunofluorescence directe .....                      | 102 |
| viii. | Immuno-migration rapide sur membrane .....            | 102 |
| A.    | Principe .....  | 102 |
| B.    | Intérêt .....   | 102 |
| C.    | Limites .....   | 103 |
| ix.   | Histologie.....                                       | 103 |
| c.    | Diagnostic indirect.....                              | 104 |
| i.    | Inhibition de l'hémagglutination.....                 | 104 |
| A.    | Principe .....  | 104 |
| B.    | Méthode .....   | 105 |
| C.    | Intérêt .....   | 106 |
| ii.   | Séroneutralisation.....                               | 107 |
| iii.  | Immunofluorescence indirecte.....                     | 107 |
| 4.    | Examens de laboratoire adaptés au sous-type 2C .....  | 107 |
| a.    | Typage des souches.....                               | 107 |
| b.    | Inhibition de l'Hémagglutination.....                 | 108 |
| c.    | Mise en culture.....                                  | 109 |
| d.    | PCR.....  | 109 |

|                        |     |
|------------------------|-----|
| TROISIEME PARTIE ..... | 113 |
|------------------------|-----|

Thérapeutique et Prophylaxie instaurées face aux différentes souches de parvovirus canin

|      |  |     |
|------|--|-----|
| I.   | TRAITEMENTS ET PRONOSTIC.....  | 115 |
| 1.   | Traitement médical symptomatique.....                                  | 115 |
| 2.   | Traitement antiviral.....  | 118 |
| 3.   | Coût.....  | 119 |
| 4.   | Pronostic .....  | 120 |
| II.  | MODALITES DE PROTECTION : LA PROPHYLAXIE MEDICALE .....                | 121 |
| 1.   | Immunité maternelle et immunité vaccinale.....                         | 121 |
| a.   | Immunité maternelle .....  | 121 |
| b.   | L'immunité vaccinale .....   | 122 |
| 2.   | Les Vaccins.....   | 124 |
| a.   | Vaccins hétérologues à base de FPV .....                               | 125 |
| i.   | Vaccin inactivé.....   | 125 |
| ii.  | Vaccin vivant atténué.....   | 125 |
| b.   | Vaccins homologues à base de CPV-2 .....                               | 126 |
| i.   | Vaccin inactivé.....   | 126 |
| ii.  | Vaccin vivant atténué conventionnel .....                              | 126 |
| A.   | Particularités.....  | 126 |
| B.   | Protocole vaccinal.....  | 127 |
| C.   | Inconvénients .....  | 129 |
| D.   | Avantages.....   | 129 |
| E.   | Innocuité.....   | 130 |
| iii. | Vaccin atténué haut titre .....  | 130 |
| c.   | Vaccins incluant les nouvelles souches CPV-2a/CPV-2b .....             | 131 |
| i.   | Le vaccin composé des souches CPV-2 (Cornell 780916) et CPV-2a : ..... | 131 |
| ii.  | Le vaccin composé des souches CPV-2 (Cornell 780916) et CPV-2b : ..... | 131 |
| A.   | Particularités.....  | 131 |
| B.   | Protocole vaccinal.....  | 134 |
| C.   | Innocuité.....   | 134 |
| d.   | Vaccins peptidiques .....  | 134 |
| e.   | Vaccins recombinants .....   | 135 |
| f.   | Vaccins ADN.....   | 136 |
| g.   | Vaccins par voie intra-nasale et orale .....                           | 137 |
| 3.   | Prophylaxie médicale des carnivores sauvages .....                     | 138 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.   | Nécessité d'un nouveau vaccin pour le type 2c? ..... | 138 |
| a.   | Un nouveau vaccin semble nécessaire .....            | 138 |
| b.   | Les vaccins actuels protègent contre CPV-2c ? .....  | 141 |
| 5.   | Prophylaxie médicale en élevage .....                | 142 |
| III. | PROPHYLAXIE SANITAIRE .....                          | 143 |
| 1.   | Prophylaxie sanitaire en élevage sain .....          | 143 |
| 2.   | Prophylaxie sanitaire en élevage infecté .....       | 143 |
|      | CONCLUSION .....                                     | 145 |
|      | LEXIQUE des ABREVIATIONS .....                       | 147 |
|      | BIBLIOGRAPHIE .....                                  | 149 |

# LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Evolution des parvovirus au cours du temps.....   | 18 |
| <b>Figure 2</b> : Récapitulatif des hypothèses concernant l'origine des souches de parvovirus canin.....  | 20 |
| <b>Figure 3</b> : Morphologie du parvovirus canin.....  | 25 |
| <b>Figure 4</b> : Dessin de la topologie du polypeptide VP2.....  | 26 |
| <b>Figure 5</b> : Structure de la protéine de capsid VP2. Elle est composée de quatre monomères (ici de différentes couleurs) qui contrôlent chacun la fixation au récepteur de la cellule à infecter et la spécificité d'espèce.....       | 27 |
| <b>Figure 6</b> : Organisation du génome et des ARN transcrits de CPV2.....   | 28 |
| <b>Figure 7</b> : Model montrant la capsid de CPV et le récepteur TfR composé de deux ectodomains.....  | 30 |
| <b>Figure 8</b> : Pénétration par endocytose du parvovirus dans une cellule.....  | 30 |
| <b>Figure 9</b> : Entrée d'un virus par endocytose.....   | 31 |
| <b>Figure 10</b> : Réplication et expression du génome viral.....   | 32 |
| <b>Figure 11</b> : Projection d'une unité asymétrique de la capsid de CPV montrant la localisation des acides aminés substitués suite aux mutations. Entouré, substitutions de FPLV à CPV-2 ; encadré, substitutions de CPV-2 à CPV-2a..... | 38 |
| <b>Figure 12</b> : Arbre phylogénétique de 91 séquences du génome de VP2 chez les carnivores domestiques.....   | 40 |
| <b>Figure 13</b> : Représentation schématique du génome de CPV-2 et de ses sous-types CPV-2a/CPV-2b.....  | 43 |
| <b>Figure 14</b> : Position des nucléotides et des acides aminés de la protéine VP2 chez les différents sous-types de parvovirus.....   | 46 |
| <b>Figure 15</b> : Arbre phylogénétique construit à partir du génome de la protéine VP2 de 75 souches de CPV-2a, 2b et 2c provenant de différents continents.....   | 48 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 16</b> : Arbre phylogénétique construit à partir du génome de la protéine VP2 des souches de CPV en fonction de leur répartition mondiale.....   | 53  |
| <b>Figure 17</b> : Distribution géographique du parvovirus canin en Europe de l'ouest (nombre de souches identifiées entre parenthèses).....   | 55  |
| <b>Figure 18</b> : Evolution des types de parvovirus en France de 1993 à 1997.....   | 56  |
| <b>Figure 19</b> : Modes de transmission.....  | 57  |
| <b>Figure 20</b> : Moyenne des titres fécaux exprimés en log10. Schémas A : chiens infectés par voie veineuse. Schémas B : chiens infectés par voie orale.....   | 58  |
| <b>Figure 21</b> : Schémas général de la virémie.....  | 69  |
| <b>Figure 22</b> : Virémie en fonction du temps.....   | 70  |
| <b>Figure 23</b> : Evolution du taux de globules blancs, lymphocytes et neutrophiles chez des chiens inoculés avec CPV-2a ou 2b.....   | 73  |
| <b>Figure 24</b> : Charge d'ADN viral retrouvé par PCR en temps réel dans différents tissus chez des chiens morts infectés naturellement par CPV-2a, 2b ou 2c.....   | 77  |
| <b>Figure 25</b> : Aspect hémorragique de la muqueuse intestinale.....   | 80  |
| <b>Figure 26</b> : Comparaison de la sévérité des lésions histopathologiques chez des chiens inoculés avec CPV-2a ou 2b.....   | 81  |
| <b>Figure 27</b> : Abrasion des villosités intestinales.....   | 82  |
| <b>Figure 28</b> : Arbre diagnostic de la Parvovirose.....   | 85  |
| <b>Figure 29</b> : Parvovirus canin en microscopie électronique avec un excès de TfR pour lier et agréger les virus.....   | 86  |
| <b>Figure 30</b> : A : Electrophorèse sur gel suite à une RFLP pour distinguer les sous-types 2a, 2b, et les nouveaux 2a et 2b. B : Mise en évidence par RFLP de la différence d'acides aminés entre CPV-2c (ou Glu-426) et les autres sous-types..... | 88  |
| <b>Figure 31</b> : La technique PCR.....   | 92  |
| <b>Figure 32</b> : Exemple de stratégie suivie dans le choix des examens de laboratoire pour la caractérisation de CPV-2.....  | 95  |
| <b>Figure 33</b> : Principe du test ELISA direct.....  | 99  |
| <b>Figure 34</b> : Principe du test ELISA compétitif.....  | 100 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 35</b> : Snap parvo, test rapide .....  | 101 |
| <b>Figure 36</b> : Test d'immunochromatographie .....   | 102 |
| <b>Figure 37</b> : Apparence caractéristique de l'intestin grêle marqué par immunofluorescence chez un animal atteint de parvovirus .....             | 104 |
| <b>Figure 38</b> : Comparaison des titres d'inhibition de l'hémagglutination chez des chiens inoculés avec différents variants de CPV-2. ....         | 106 |
| <b>Figure 39</b> : Protocole de traitement à l'interféron Oméga Félin.....  | 118 |
| <b>Figure 40</b> : La période critique en fonction du temps.....  | 123 |
| <b>Figure 41</b> : Cinétique des anticorps neutralisants après vaccination avec une souche CPV-2. ....  | 127 |
| <b>Figure 42</b> : Réponse vaccinale de quatre portées de chiots vaccinés avec Novibac DP, à 6 et 9 semaines .....                                    | 129 |
| <b>Figure 43</b> : Représentation schématique des chimères : insertion d' épitopes à l'extrémité 5' dans la structure protéique de PhMV.....          | 135 |
| <b>Figure 44</b> : Comparaison du pouvoir immunogène de différentes formules vaccinales face à CPV-2 mesuré par inhibition de l'hémagglutination..... | 136 |



# LISTE DES TABLEAUX

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 1 :</b> Evolution moléculaire et transmission interspécifique du parvovirus au cours du temps. ....   | 21  |
| <b>Tableau 2 :</b> Classification des parvovirus.....  | 23  |
| <b>Tableau 3 :</b> Résidus de surfaces : les chaînes du polypeptide qui composent l'axe triple .....   | 26  |
| <b>Tableau 4 :</b> Séquences d'acides aminés codées par le génome de VP2 renseignant sur la phylogénie des différentes souches de parvovirus.....  | 45  |
| <b>Tableau 5 :</b> Sensibilité des espèces.....  | 60  |
| <b>Tableau 6 :</b> Répartition des symptômes observés par fréquence.....   | 71  |
| <b>Tableau 7 :</b> Comparaison des données cliniques chez des chiens infectés par des variants de CPV-2.....   | 72  |
| <b>Tableau 8 :</b> Présence de CPV chez les chats non vaccinés.....  | 78  |
| <b>Tableau 9 :</b> Identification de CPV-2c par la réaction d' anticorps monoclonaux (MABs) sur CPV-2, 2a, 2b et du nouveau sous-type (CPV-2 ?) avec la technique d'hémagglutination par inhibition.....     | 109 |
| <b>Tableau 10 :</b> Mode de transfert des anticorps maternels au chiot.....  | 121 |
| <b>Tableau 11 :</b> Mise à jour du protocole vaccinal aux Etats-Unis.....  | 128 |
| <b>Tableau 12 :</b> Résultats des tests de séroneutralisation face à CPV-2 et CPV-2b chez des chiots vaccinés avec des vaccins vivants modifiés CPV-2 ( <i>figure A</i> ) et CPV-2b ( <i>figure B</i> )..... | 132 |
| <b>Tableau 13 :</b> Observations cliniques et historique vaccinal chez des chiens infectés par le parvovirus.....  | 140 |
| <b>Tableau 14 :</b> Observations cliniques sur des chiots vaccinés puis infectés par CPV-2c et sur des témoins non vaccinés mais infectés.....   | 141 |
| <b>Tableau 15 :</b> Taux de protection chez des chiens vaccinés avec CPV-2 ou 2a et CVD (maladie de Carré) après inoculation de CPV-2b et 2c par voie oro-nasale et CVD par voie veineuse.....               | 142 |



# INTRODUCTION

Les Parvoviridae sont présents chez de nombreuses espèces animales et même chez l'homme. Dans l'espèce canine, il existe deux parvovirus canins : CPV-1, aujourd'hui presque disparu, et CPV-2 qui fera l'objet de notre étude.

Le parvovirus canin CPV-2, autrement appelé virus de la gastro-entérite virale contagieuse, est un agent pathogène viral majeur qui circule aujourd'hui de façon enzootique dans les populations canines du monde entier. Malgré une prophylaxie respectée, c'est une des maladies infectieuses les plus fréquentes et les plus graves redoutée par les élevages canins. Depuis 30 ans, trois sous-types différents de parvovirus canins ont été décrits. Le parvovirus canin est l'exemple type du virus émergent qui s'est rapidement répandu dans le monde. L'évolution moléculaire et phénotypique des souches du parvovirus est un modèle souvent étudié et utilisé pour expliquer le passage d'un virus d'une espèce à une autre et l'évolution de la virulence, ces phénomènes étant les facteurs essentiels à l'origine de l'émergence de nouvelles maladies infectieuses.

Notre étude portera donc sur l'évolution du parvovirus canin, et principalement sur la découverte du nouveau sous-type, CPV-2c. L'histoire du parvovirus canin, sa phylogénie et son épidémiologie occupent une place importante de cette étude et seront développées dans une première partie. De plus, les mutations à l'origine des différents sous-types ont des conséquences sur les formes cliniques engendrées par le parvovirus canin qui font ainsi l'objet d'une seconde partie. Les différents examens de laboratoires, mettant en évidence une infection par un des sous-types du parvovirus, seront détaillés dans cette même partie. Enfin, le traitement symptomatique possible et les mesures sanitaires appliquées seront exposés dans une troisième partie. Cette dernière partie permet encore d'étudier les différents types de vaccins développés pour lutter contre le parvovirus et d'approfondir le débat sur la nécessité de nouveaux vaccins face à l'extension de CPV-2c.



## **PREMIERE PARTIE:**

### **Présentation du Parvovirus canin et Epidémiologie des différents sous-types viraux**



## I. HISTORIQUE

### 1. Découverte du parvovirus canin

Des études phylogénétiques montrent que tous les types de parvovirus canin découlent d'un même ancêtre commun apparu dans les années 1970, très proche du virus de la panleucopénie féline, mais aujourd'hui toujours non identifié. Nous retracerons donc ici l'historique de ce virus (FIGURE 1).

#### 1928:

Découverte de FPV, parvovirus du chat, autrement appelé virus de la Panleucopénie infectieuse féline ou encore Typhus du chat, des renards et des rats laveurs. **SASSA Y *et al* (2006)**. Ce virus provoque à cette époque une mortalité élevée de l'ordre de 80% chez les chats infectés. En 1947, une épizootie est déclenchée dans le zoo de Londres où les félinés sauvages sont contaminés. **STEINEL A *et al* (2001)**. La plupart du temps, on isole aujourd'hui le parvovirus canin chez les chats atteints de typhus. Le virus de la panleucopénie féline tend donc à disparaître.

#### 1970:

Découverte du Parvovirus canin de type 1 CPV-1 ou canine minute virus responsable de troubles de la fertilité ou d'avortements sur des chiennes infectées durant la première moitié de la gestation.

#### 1977 :

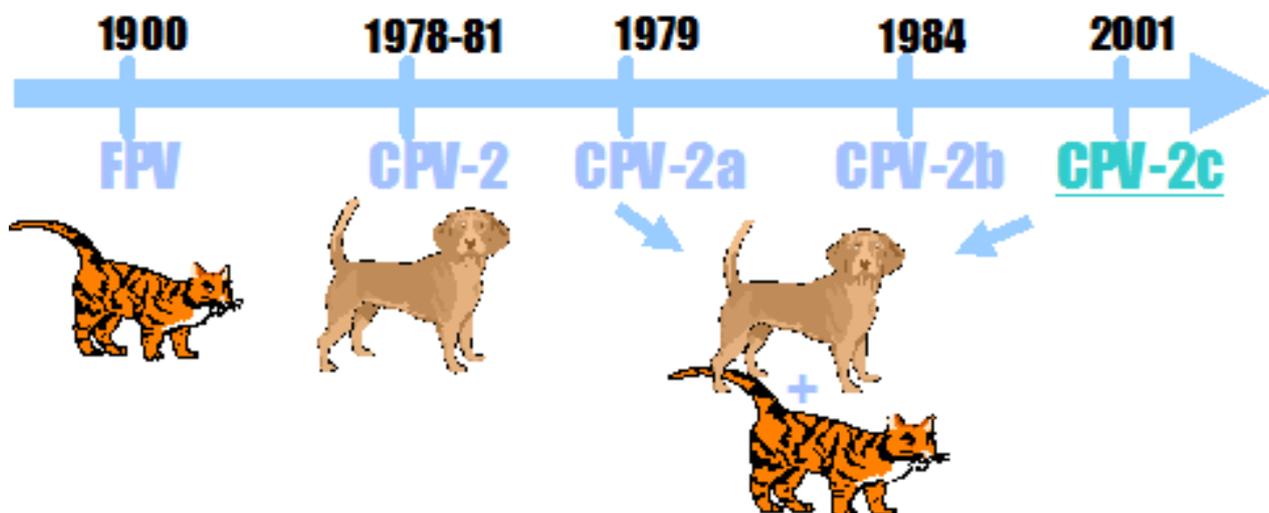
Découverte et identification du parvovirus canin CPV-2. Des cas de gastro-entérite contagieuse sont décrits dans l'Etat du Texas aux Etats-Unis chez des chiens de race colley. En 1978, des épizooties localisées au sud des Etats-Unis sont rapportées et se répandent dans tout le pays. Une deuxième vague de diarrhée sévère à fort taux de morbidité se répand ensuite dans le pays et au Canada chez des jeunes chiots. Une panzootie due à CPV-2 se répand alors dans la population canine du monde entier dans les années 1980, tuant des centaines de chiens en quelques mois. Ainsi, l'Australie, la Belgique et les Pays-Bas sont touchés en 1979 puis la France, l'Angleterre, l'Amérique du Sud, l'Afrique, l'Indonésie et enfin la Russie rapportent des cas de parvovirose. Afin de déterminer quand est apparu exactement ce virus, des enquêtes sérologiques ont été effectuées sur des échantillons congelés durant cette période. Ainsi, la sérologie positive la plus ancienne daterait de 1976 en Belgique **APPEL M *et al* (1978)**. Cependant, il semblerait que CPV-2

soit apparu 10 ans avant sa découverte, soit dans les années 1970. Le virus se serait maintenu discret et rare dans les populations durant plusieurs années en accumulant des mutations positives jusqu'à entraîner une panzootie. La croissance exponentielle qu'a connue ce virus s'explique donc par la sélection naturelle positive qui a conduit à son émergence. Sa diffusion aurait ensuite doublé en 5 ans **SHACKELTON L *et al* (2004)**.

L'origine de CPV-2 est controversée : certains pensent que des mutations de FPV ont donné CPV-2 ; d'autres suggèrent que CPV-2 viendrait de modifications de souches vaccinales de FPV ou de CPV-1. Enfin, une origine dérivée de virus de la faune sauvage est envisagée. Dans cette dernière hypothèse, CPV-2 serait né chez un carnivore sauvage comme le renard ou le vison qui auraient ainsi hébergé l'ancêtre direct de CPV-2. L'hypothèse du mutant direct de FPV est un scénario identique à celui qui explique l'émergence du MEV (virus entérique du vison) dans les années 1940. **TRUYEN *et al*** a montré en **1992** que FPV peut se multiplier *in vitro* dans le thymus et la moëlle osseuse canine. Il suffit donc à l'ancêtre de CPV-2 d'acquérir la capacité de se multiplier dans les intestins pour pouvoir se répandre dans la population canine.

Après 1985, CPV-2 se fait de plus en plus rare et sera remplacé par d'autres sous-types. CPV-2 peut être actuellement considéré comme disparu, ayant représenté en quelque sorte, un stade évolutif intermédiaire entre un parvovirus antérieur non identifié et les variants CPV-2a et CPV-2b mieux adaptés à l'espèce canine.

**Figure 1** : Evolution des parvovirus au cours du temps. D'après **Polycopié de Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (2006/2007)**



## 2. Découverte des sous types CPV-2a et CPV-2b

1981:

Découverte de CPV-2a. Il semblerait que CPV-2a soit apparu 8 ans avant sa découverte, soit dans les années 1970. Il cohabitait avec CPV-2 et descendrait de ce dernier. CPV-2a peut infecter les hôtes canins et félins à l'inverse de CPV-2 spécifique des canidés. La diffusion spectaculaire du virus dans la population canine et féline fut à l'origine d'une épidémie majeure (avec CPV-2). Elle a été estimée à une multiplication par deux de la quantité de virus en 2,3 ans. **SHACKELTON L *et al* (2004)**. Après 1985, CPV-2a domine dans certaines régions du monde alors que CPV-2b est majoritaire dans d'autres pays. Il existerait aujourd'hui quatre variants principaux de CPV-2a implantés dans les populations. En effet, CPV-2a peut différer d'un ou deux acides-aminés sur des sites mineurs en fonction des régions du monde où il s'est développé. Par exemple, il existe deux sous-types asiatiques différents du sous-type européen ou du sous-type américain.

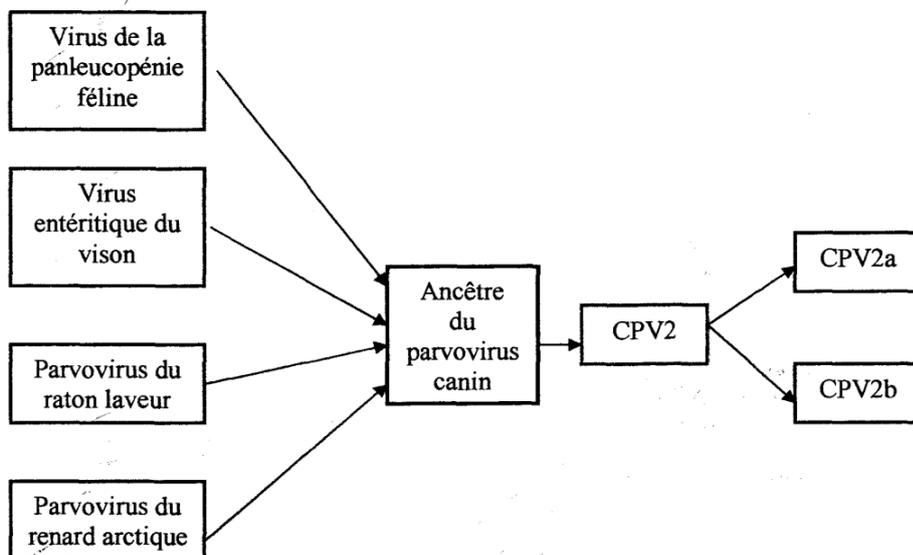
1984 :

Découverte de CPV-2b qui descendrait lui aussi de CPV-2 et le remplace totalement, en co-habitant avec CPV-2a, dès 1985. CPV-2 n'existe alors plus que dans les souches vaccinales.

CPV-2b s'est répandu moins rapidement que CPV-2a et ne l'a pas remplacé. Il domine dans certains pays où CPV-2a est minoritaire.

La sélection immunologique a joué un rôle certain dans l'évolution du virus: ces nouveaux types antigéniques ont perdu un épitope neutralisant par rapport à CPV-2. La sélection positive et le fort taux de mutation du parvovirus seraient les deux éléments principalement responsables de l'apparition de nouvelles souches de parvovirus canin. (FIGURE 2)

**Figure 2 :** Récapitulatif des hypothèses concernant l'origine des souches de parvovirus canin.  
D'après **Vollmer H (2005)**



### Évolution :

Une étude menée par **OHSHIMA T et al.** en **2008** tente de retracer l'historique du parvovirus canin au Japon en analysant 55 souches de CPV récoltées de 1980 à 2006 et congelées. Ils découvrent alors l'apparition de « nouveaux CPV-2a » en 1987 et « nouveaux CPV-2b » en 1997. Le « nouveau CPV-2a » commence à se développer en 1990 et le « nouveau CPV-2b » est retrouvé de plus en plus fréquemment dès 2000. Ces « nouveaux » sous-types tendraient à remplacer les premiers CPV-2a et 2b dans cette partie du monde. Sur les autres continents, il semble que CPV-2a et 2b aient conservé leur configuration antigénique initiale durant une quinzaine d'années, jusqu'en 2000 où une nouvelle souche apparaît.

### 3. Découverte du sous-type 2c

1997:

Découverte de deux nouvelles souches de parvovirus par **IKEDA et al (2002)** : CPV-2c(a) et CPV-2c(b), autrement appelées Asp-300, isolées de Léopards au Vietnam et de chiens en Corée.

(TABLEAU 1). Ces souches proviendraient des « nouveaux CPV-2a et 2b » qui auraient subi une mutation entraînant la substitution d'un acide aminé majeur. **OHSHIMA T et al (2008)**

2000 :

Découverte d'une troisième souche nommée CPV-2c ou GLU-426 par **BUONAVOGLIA et al (2001)** en Italie (TABLEAU 1). Au Vietnam, cette même souche est identifiée pour la première fois en **2004**, **NAKAMURA et al**, puis en Espagne, en 2006 **DECARO N et al (2006 d)**. De même, en 2006, CPV-2c est retrouvé chez des chiens présentant des symptômes de parvovirose en Inde **NANDI S et al (2009)** et en Amérique du sud (Uruguay, Brésil) **PEREZ R et al. (2007)**. En Allemagne, au Portugal et au Royaume-Uni, CPV-2c est identifié en 2007. **DECARO N et al 2008 ; VIEIRA J et al (2008)**.

CPV-2c, autrement appelé mutant GLU-426, présente une mutation sur un des sites antigénique majeur. Il pourrait être un mutant échappé d'un vaccin ou il dériverait d'une mutation sur CPV-2b. Il remplacerait déjà CPV-2b dans des pays comme l'Italie où il correspond en 2004 à 60% des souches analysées. **MARTELLA V et al (2005)**. Ce nouveau type se répand donc rapidement sur toute la planète et présente une menace sanitaire considérable pour les espèces cibles. (TABLEAU 1)

**Tableau 1:** Evolution moléculaire et transmission interspécifique du parvovirus au cours du temps. D'après **MARTELLA V et al ; (2003)**.

| Virus type    | Country of origin, year of isolation | Strain     | Source animal | Amino acid changes at residue: |     |            |     |            |     |            |     |
|---------------|--------------------------------------|------------|---------------|--------------------------------|-----|------------|-----|------------|-----|------------|-----|
|               |                                      |            |               | 87                             | 101 | 265        | 297 | 300        | 305 | 426        | 555 |
| FPV           | U.S., 1967                           | FPV-b      | Cat           | Met                            | Ile | Thr        | Ser | Ala        | Asp | Asn        | Val |
| MEV           | U.S., 1975                           | MEV-b      | Mink          | Met                            | Ile | Thr        | Ser | Val        | Asp | Asn        | Val |
| CPV-2         | U.S., 1978                           | CPV-b      | Dog           | Met                            | Ile | Thr        | Ser | Ala        | Asp | Asn        | Val |
| CPV-2a        | U.S., 1978                           | CPV-Norden | Dog           | Met                            | Ile | Thr        | Ser | Ala        | Asp | Asn        | Val |
|               | U.S., 1984                           | CPV-15     | Dog           | Leu                            | Thr | Thr        | Ser | Gly        | Tyr | Asn        | Ile |
| CPV-2b        | U.S., 1983                           | CPV-31     | Dog           | Leu                            | Thr | Thr        | Ser | Gly        | Tyr | Asn        | Ile |
|               | U.S., 1984                           | CPV-39     | Dog           | Leu                            | Thr | Thr        | Ser | Gly        | Tyr | Asp        | Val |
| Asp-300 CPV-2 | U.S., 1990                           | CPV-133    | Dog           | Leu                            | Thr | Thr        | Ser | Gly        | Tyr | Asp        | Val |
|               | Vietnam, 2000                        | LCPV-V203  | Leopard       | Leu                            | Thr | Thr        | Ala | <b>Asp</b> | Tyr | Asp        | Val |
| Pro-265 CPV-2 | Vietnam, 2000                        | LCPV-V140  | Leopard       | Leu                            | Thr | Thr        | Ala | <b>Asp</b> | Tyr | Asn        | Val |
|               | Italy, 2000                          | CPV-616    | Dog           | Leu                            | Thr | <b>Pro</b> | Ser | Gly        | Tyr | Asp        | Val |
| Glu-426 CPV-2 | Italy, 2000                          | W42        | Wolf          | Leu                            | Thr | <b>Pro</b> | Ser | Gly        | Tyr | Asp        | Val |
|               | Italy, 2000                          | 136/00     | Dog           | Leu                            | Thr | Thr        | Ala | Gly        | Tyr | <b>Glu</b> | Val |
|               | Italy, 2000                          | 56/00      | Dog           | Leu                            | Thr | Thr        | Ala | Gly        | Tyr | <b>Glu</b> | Val |

<sup>a</sup> Recently identified parvovirus mutants are shown in bold.

Les trois sous-types CPV-2c, CPV-2c(a) et CPV-2c(b) sont regroupés actuellement dans le sous-type CPV-2c.

En conclusion, trois souches coexistent aujourd'hui sur toute la planète : CPV-2a, 2b et 2c. Aux vues de l'histoire du virus, on comprend que l'épidémiosurveillance du parvovirus canin est fondamentale pour comprendre son évolution et développer des mesures préventives afin de contrôler l'expansion des nouveaux variants pouvant engendrer une panzootie, aujourd'hui redoutée avec l'expansion de CPV-2c.

#### 4. Législation

La parvovirose est classée "vice rédhibitoire" par l'article 2 de la loi du 22 juin 1989. L'arrêté du 22 août 1990 complète cette loi : En effet, depuis l'épizootie des années 1980, cette maladie rapidement mortelle est dépistée chez les chiots afin d'indemniser les propriétaires et de contrôler la maladie. L'acheteur peut donc exercer un recours vers le vendeur si le chien qu'il vient d'acquérir déclare cette maladie, sous réserve:

- que la parvovirose ait été suspectée par un vétérinaire dans le délai maximal de cinq jours à dater de la livraison de l'animal. Ce délai est basé sur la durée d'incubation de la maladie : il renforce la nécessité d'un diagnostic rapide. (Le délai de garantie pour engager un expert est fixé à 30 jours) ;
- qu'un certificat détaillé ait été rédigé ;
- que des examens complémentaires soient réalisés: mise en évidence du virus dans un échantillon de selles, recherche des anticorps spécifiques dans le sérum (à partir du cinquième jour après infection), recherche des lésions caractéristiques à l'autopsie...

Les critères de suspicion retenus sont l'anorexie, la prostration, la gastro-entérite avec déshydratation, la leucopénie. Les critères de suspicion complémentaires sont l'âge du chien (6 à 8 semaines), la nature hémorragique des selles et la rapidité d'évolution (5 jours).

Cette réglementation est l'occasion de souligner une fois de plus l'importance de la visite d'achat: le délai de garantie très court justifie de recommander à tout acheteur de faire réaliser cette visite au plus tard le cinquième jour après la livraison.

## II. PRESENTATION DE L'AGENT PATHOGENE

### 1. Classification

La famille des *Parvoviridae* regroupe deux sous familles : les Parvovirinae chez les vertébrés et les Densovirinae chez les invertébrés.

Parmi les Parvovirinae, on trouve le genre Parvovirus, mais aussi Dépendovirus (virus dont le cycle viral dépend d'un adénovirus) et Erythrovirus.

Le genre Parvovirus contient plusieurs virus qui infectent les mammifères. Les jeunes de ces espèces en sont la cible préférentielle car ces virus se multiplient lors de la division cellulaire. Ils provoquent des symptômes souvent similaires (TABLEAU 2).

**Tableau 2 : Classification des parvovirus. D' après Polycopié de Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (2006/2007)**

| VIRUS  | ANIMAUX | DISTRIBUTION               | SYMPTOMES   |
|--|---------|----------------------------|---|
| Virus de la panleucopénie féline (FPV)                   | chat    | mondiale                   | Entérite, état typhique, hypoplasie du cervelet, leucopénie |
| Parvovirus canin de type 1 (CPV1 ou canine minute virus) | chien   | Mondiale (presque disparu) | Avortements, troubles de la fertilité                       |
| Parvovirus canin de type 2 (CPV2)                        | chien   | mondiale                   | Gastro-entérite, leucopénie, myocardite                     |
| Parvovirus porcin (PPV)                                  | porc    | mondiale                   | Mortalité néonatale, momification, infertilité, avortement. |
| Parvovirus B19   | Homme   | mondiale                   | Avortements   |
| Virus de l'entérite du                                   | vison   | USA, Europe                | Entérite, leucopénie  |

|  |        |        |   |
|--|--------|--------|---|
| vison (MEV)                              |        |        |   |
| Virus de la maladie aléoutienne du vison | vison  |        | Maladie à immun-complexes, encéphalopathies |
| Virus de la maladie de Derszy            | oie    | Europe | Hépatite                                    |
| Virus minute de la souris (MVM)          | souris |        |   |
| Parvovirus bovin                         | bovin  |        | Avortements                                 |

Le Parvovirus appartient aux virus de groupe 2, soit virus à ADN non enveloppés.

Le parvovirus canin de type 2, CPV-2, est différent de CPV-1 responsables de mort néonatale. Ainsi, deux sous-groupes sont distingués à partir des arbres phylogénétiques élaborés, des symptômes engendrés et des modes de transmission :

- Les virus de type FPV regroupant FPV, CPV-1, MEV, MVM...
- Les virus de type CPV regroupant les différentes souches de CPV-2.

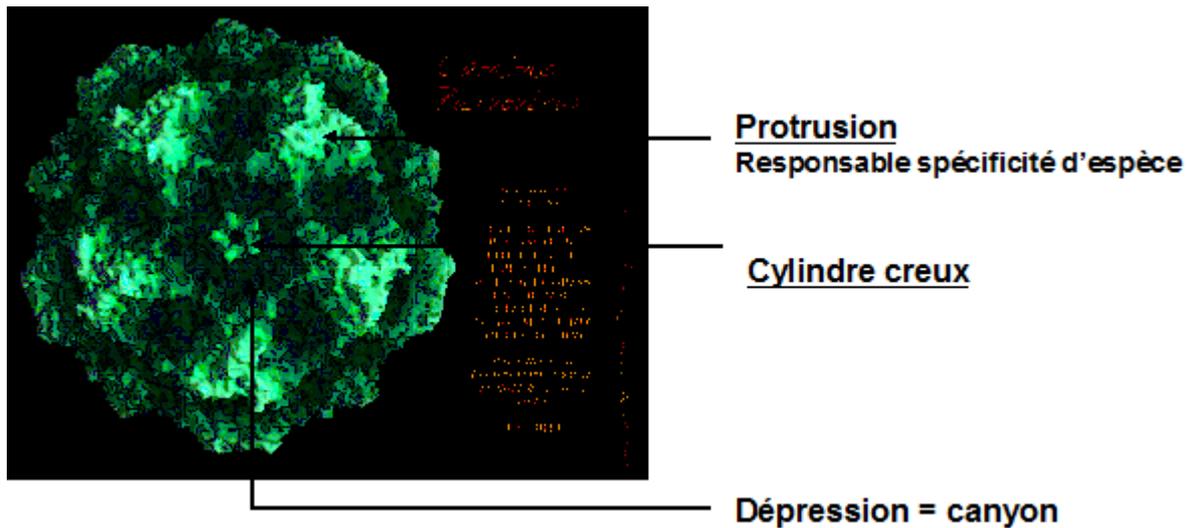
## 2. Morphologie et structure

### a. *Morphologie :*

Ce virus nu, de petite taille comprise entre 18 et 26 nm de diamètre, ressemble à de petits grains de sable avec une structure icosaédrique. (FIGURE 3). Sa masse moléculaire est de 5,5 à 6,2. 10<sup>6</sup> Daltons pour une particule complète et 1,4. 10<sup>6</sup> Daltons pour une particule vide sans ADN.

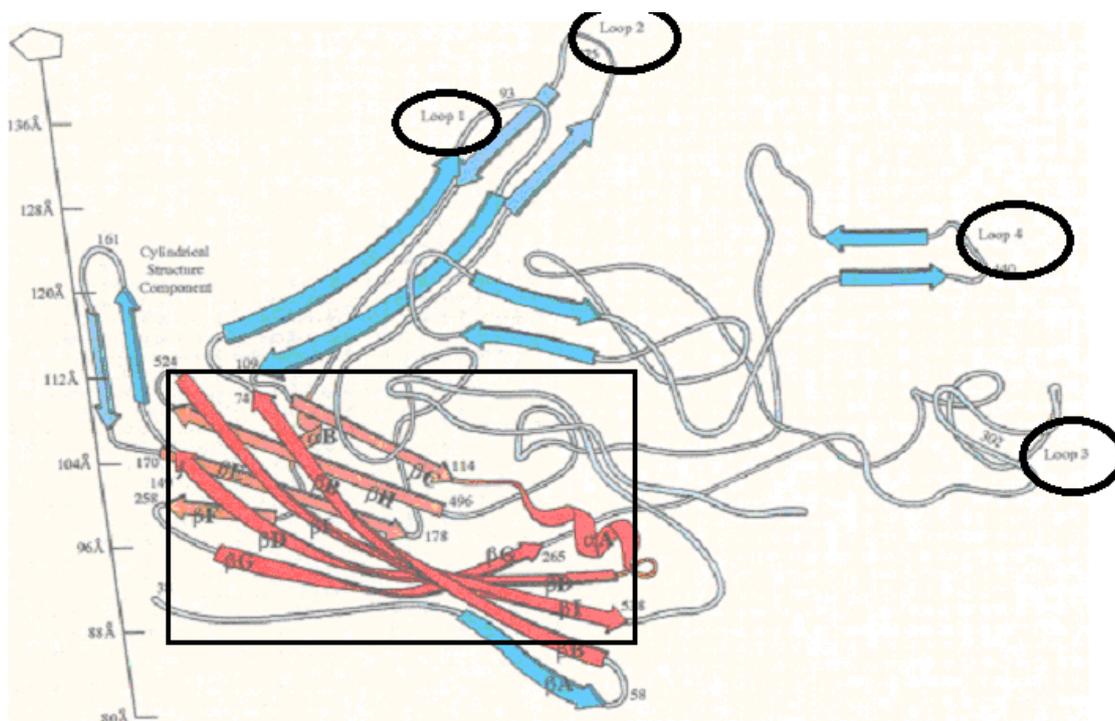
La capsid se caractérise par son épaisseur considérable de 6 nm qui explique en partie sa grande stabilité. La structure icosaédrique de la capsid a été déterminée par diffraction aux rayons X. La capsid est constituée d'un assemblage de 60 copies d'une combinaison des protéines VP1, VP2 et VP3 codées par 13% du génome.

**Figure 3** : Morphologie du parvovirus canin. D'après **SGRO J-Y *et al*** ; (1991).



VP2 est majoritaire car elle représente 90% de la structure. 10 sites antigéniques présents sur VP2 permettent la fixation d'anticorps neutralisants. (FIGURE 5). **TSAO J *et al*** (2008) mettent en évidence la topologie du polypeptide VP2 (FIGURE 4). La structure centrale correspondant à un tiers du polypeptide est composée de 8 feuillets  $\beta$  anti-parallèles reliés par des insertions larges. Cette structure est similaire chez de nombreux virus icosaédriques. Des feuillets  $\beta$  parallèles composent, eux, les résidus qui font protrusion à la surface de la capsid, à chaque sommet de l'icosaèdre, et sont responsables des propriétés antigéniques du virus. En effet, des parties contre lesquelles se dirigent les anticorps font protrusion à la surface du virion, ce sont les domaines antigéniques. Par exemple, au niveau de l'axe triple formé par quatre Loops qui font protrusion à la surface du virus (TABLEAU 3 et entourés sur la FIGURE 4), un spicule contiendrait les acides aminés impliqués dans les propriétés d'antigénicité et d'hémagglutination. Les numéros des acides aminés sont donnés de manière stratégique en fonction de leur localisation. Deux épitopes A et B sont situés sur ce spicule. L'épitope B est situé sur « une épaule » du spicule et joue un rôle majeur dans les caractéristiques antigéniques des différentes souches de parvovirus et dans la neutralisation possible lors de la fixation d'anticorps sur ces sites antigéniques. Un clivage par des trypsines aurait lieu pour activer certains sites de VP2.

**Figure 4** : Dessin de la topologie du polypeptide VP2. D'après TSAO J *et al* (2008).



**Tableau 3** : Résidus de surfaces : les chaînes du polypeptide qui composent l'axe triple. D'après TSAO J *et al* (2008).

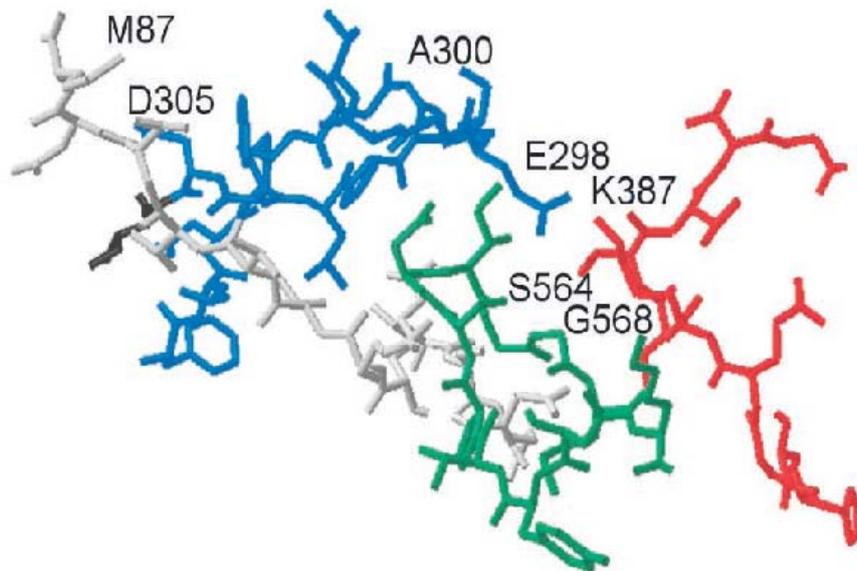
| Name    | Position          | Start | At top of protrusion | End  |
|---------|-------------------|-------|----------------------|------|
| Loop 1  | $\beta B-\beta C$ | V84   | V92, N93             | D99  |
| Loop 2* | $\beta E-\beta F$ | R216  | H222-T228            | G235 |
| Loop 3  | $\beta G-\beta H$ | P295  | A300-F303            | I306 |
| Loop 4† | $\beta G-\beta H$ | Y409  | N421-N428, T433-N443 | Y444 |

\*Largest viral radius. †Greatest number of residues.

Les dépressions permettent l'adhésion du virus à la cellule cible, comme au niveau de l'axe double. (FIGURE 3) VOLLMER H (2005). Au niveau de l'axe quintuple, une structure cylindrique formée de 5 feuilletts  $\beta$  pourrait correspondre à un site de fixation pour un récepteur (encadré sur la FIGURE 4).

VP3 nécessite un clivage par des enzymes de l'hôte infecté pour être activé. Ces protéines sont spécifiques du type de parvovirus. 20% des virus trouvés sont des capsides vides non infectieuses qui ne contiennent pas VP3.

**Figure 5:** Structure de la protéine de capsid VP2. Elle est composée de quatre monomères (ici de différentes couleurs) qui contrôlent chacun la fixation au récepteur de la cellule à infecter et la spécificité d'espèce. D'après **HUEFFER K et al (2003)**.



*b. Organisation génomique :*

L'ADN, simple brin, plus ou moins continu et linéaire, de polarité négative, de petite taille (5 kpb) est compacté à l'intérieur de la capsid. (FIGURE 6)

Le génome, de 5323 nucléotides, possède deux promoteurs à l'origine de deux types de protéines :

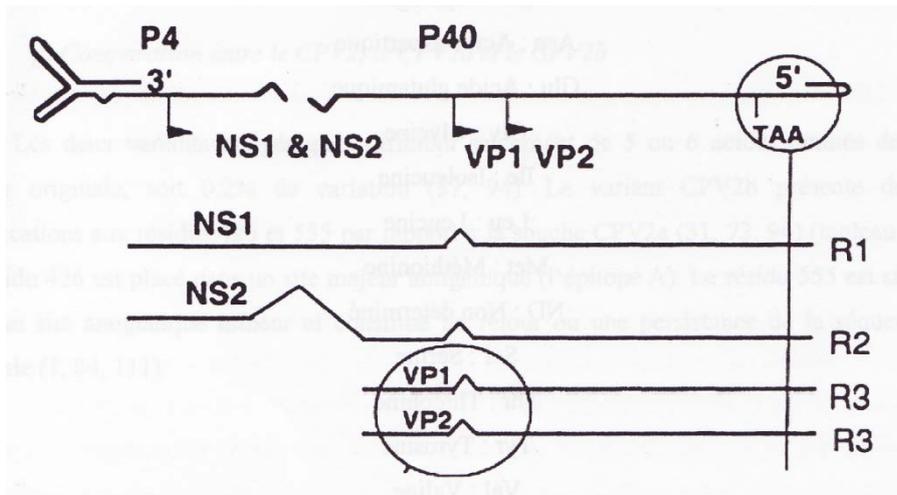
- La transcription du génome à partir du promoteur P4 qui fournit l'ARNm R2 à l'origine de la protéine NS2 et l'ARNm R1 à l'origine de NS1.
- Le promoteur P40 à l'origine de VP1 et VP2 par traduction de l'ARNm R3.

Une séquence non codante est présente à l'extrémité 5'. On trouve également des séquences palindromiques à l'extrémité 3' qui interviennent dans la réplication de l'ADN.

La totalité de la séquence du parvovirus canin a été identifiée.

Le génome code donc pour trois protéines structurales : VP1, VP2 (protéine majeure de capsid) et VP3 ; et trois protéines non structurales : NS1 (réplication et expression du génome), NS2 (assemblage de la capsid) et Rep (réplication du génome). (FIGURE 6).

**Figure 6 :** Organisation du génome et des ARN transcrits de CPV2. D'après **PARRISH C *et al* (1999)**.



Ce virus à ADN non enveloppé présente une grande stabilité dans l'environnement. Les virus à ADN sont normalement stables. Cependant, les parvovirus mutent beaucoup sur une échelle de temps brève. Ils ont la même capacité de mutation que des virus à ARN ce qui leur confère une grande capacité d'adaptation et d'évolution.

### 3. Caractères physico-chimiques

Les parvovirus sont les virus les plus résistants dans le milieu extérieur. Ils peuvent survivre jusqu'à un an à température ambiante et résistent à de nombreux traitements hygiéniques agressifs (détergents, solvants, 60min à 60C°...). Le parvovirus résiste au froid et peut être conservé congelé. Cependant, il perd une partie de son pouvoir infectieux si les matières fécales dans lesquelles il est conservé sont déshydratées. De même, il est détruit par les rayons ultra-violet et perd de sa résistance au soleil. Il est capable de résister à des PH très acides (inférieur à 3) ce qui lui permet de résister à l'acidité gastrique et de traverser le tube digestif en conservant son pouvoir pathogène.

L'eau de javel diluée au maximum au 30°, le formol (1/100°) et un lavage d'une minute à 100°C permettent d'éliminer le parvovirus. Le glutaraldéhyde est vraisemblablement la molécule la plus efficace mais sa toxicité s'oppose à son emploi au contact des animaux. Ainsi, ils persistent dans les élevages plusieurs mois en particulier dans les chenils, les bâtiments et les aires d'exercice.

**Polycopié de Virologie, ENVA (2006/2007).**

#### 4. Le cycle viral

L'infection virale est aigüe, avec une vitesse de transmission rapide. La charge virale dure peu de temps (quinze jours à trois semaines).

Le virus se localise dans un épithélium muqueux pluristratifié : principalement dans l'épithélium digestif qui présente des récepteurs aux virions. Il entre dans ces cellules où il est amplifié et il dissémine à partir du tube digestif jusque dans les fèces.

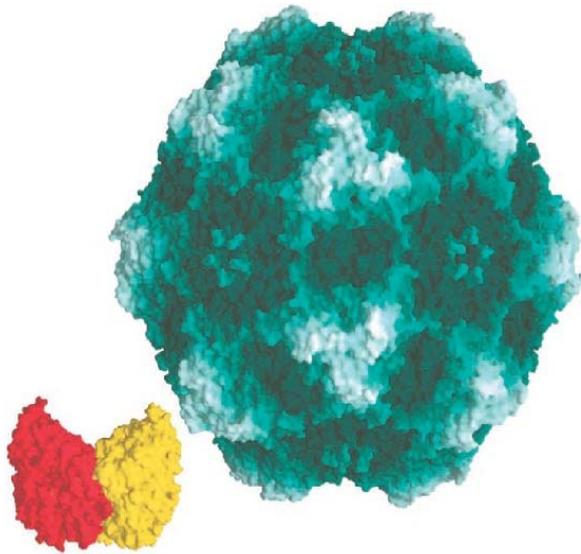
Le parvovirus se réplique uniquement dans le noyau des cellules en division, durant la phase S du cycle cellulaire. En effet, il utilise l'ADN polymérase de la cellule infectée pour fabriquer l'ADN double brin temporaire. Cet enzyme est présente uniquement pendant la mitose cellulaire. Ainsi, des types cellulaires particuliers sont visés par les parvoviridae comme les cardiomyocytes du chiot et les cellules de Purkinje du cervelet du chaton, les entérocytes des cryptes, les cellules lymphoïdes et les cellules souches hématopoïétiques de la moëlle osseuse.

1. attachement : à un récepteur cellulaire grâce à des protéines de surface (VP1 et VP2). Le Parvovirus se fixe au domaine apical du récepteur à la transferrine (TfR). (FIGURE 7 et FIGURE 8). Le virus devient alors résistant aux anticorps neutralisants.

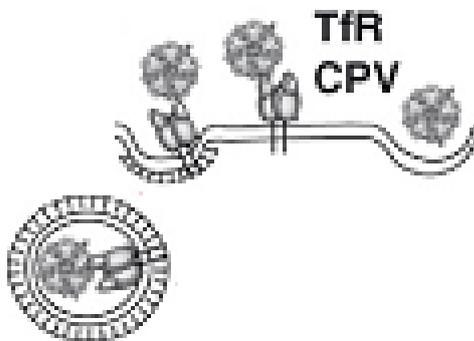
Une étude de **HUEFFER K *et al* (2003)**, montre comment le virus reconnaît les cellules à infecter. Les différentes souches de parvovirus présentent une liaison spécifique à un récepteur transferrine (TfR) situé à la surface des cellules cibles (FIGURE 7). En effet, quand on bloque ce récepteur la capacité d'infection du parvovirus chute de 80 à 100%. La liaison dépendrait surtout du type de cellule, de la souche de virus et de l'espèce infectée mais le pH et la température ont peu d'effet. Les sites qui se fixent à TfR et contrôlent l'efficacité de la liaison aux cellules sont situés au sommet et sur un côté (« l'épaule ») de VP2. Un co-récepteur favoriserait aussi la liaison. La microscopie cryoélectronique et des analyses biochimiques ont permis de découvrir que ce TfR ne peut se lier qu'à certains sites de l'icosaèdre d'un virion ce qui prouve que le parvovirus est asymétrique. **HAFENSTEIN S *et al* (2007)**

**HUEFFER K *et al* (2003)** montre que si l'on échange les résidus 93 et 323 de la protéine VP2 de FPV avec ceux de CPV, FPV acquiert la capacité de se fixer aux TfR des cellules canines. Réciproquement, CPV modifié se fixe beaucoup moins facilement et infecte peu de cellules canines. Ces résidus jouent donc un rôle important dans la fixation à TfR et cette liaison est effectivement à l'origine de l'infection des cellules canines mais d'autres mécanismes mineurs doivent aussi exister.

**Figure 7** : Model montrant la capside de CPV et le récepteur TfR composé de deux ectodomaines.  
D'après HUEFFER K *et al* (2003).



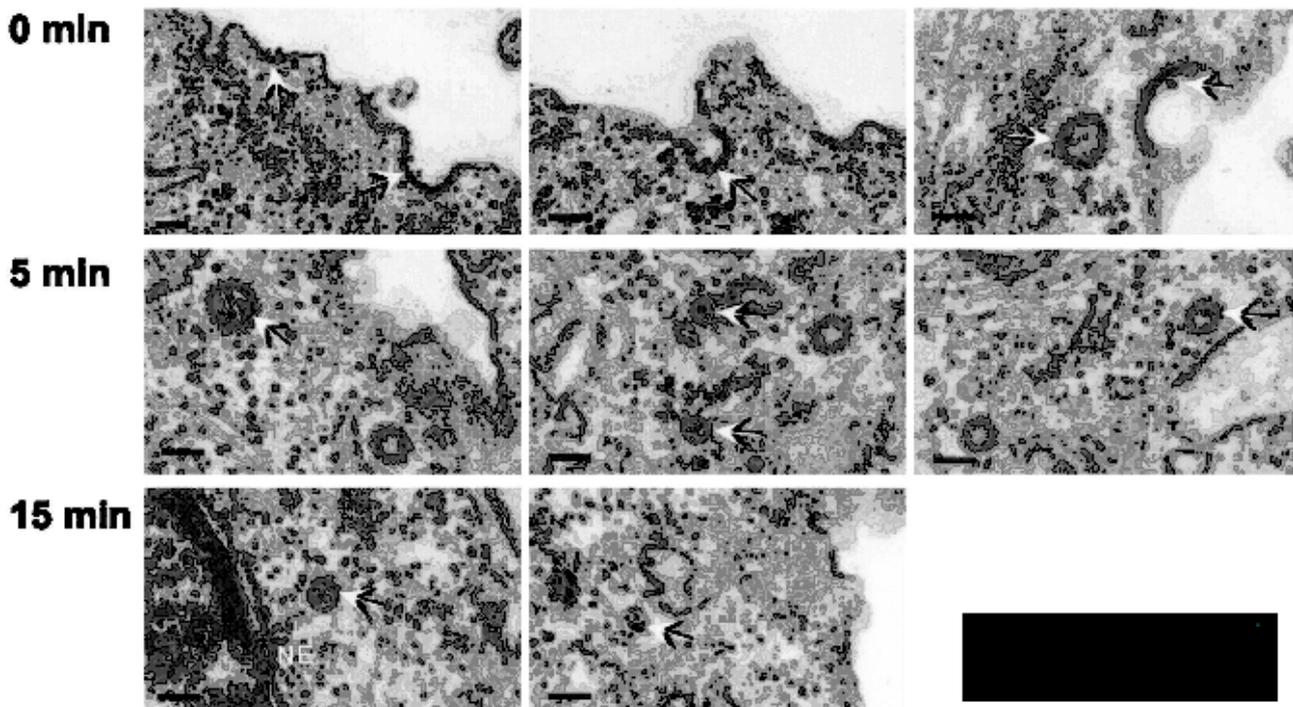
**Figure 8** : Pénétration par endocytose du parvovirus dans une cellule. D'après HARBISON *et al* (2008)



2. pénétration : entrée dans une cellule en division par endocytose car c'est un virus nu (FIGURE 8 et 9). Le virus s'accroche par son récepteur TfR à la membrane plasmique qui forme un repli individualisé, l'endocyte, puis donne l'endosome 15 minutes après l'infection. Cette endocytose est dépendante d'un médiateur, la dynamine, ainsi que d'un pH acide, une température physiologique et de l'intégrité de microtubules qui permettent la fusion de plusieurs endosomes. L'interaction entre les protéines virales et les intégrines de la membrane plasmique intégrées dans l'endosome déclenche une acidification qui conduit à la

lyse du lysosome et la libération du génome viral dans le cytoplasme cellulaire. C'est la décapsidation. Lors de cette étape, des anticorps qui se fixeraient sur la capsidie pourraient masquer des structures nécessaires à la libération de l'ADN viral. **VIHINEN-RANTA M et al (2000)** examine le rôle de la capsidie de CPV dans le transport au sein du cytoplasme des cellules à l'aide d'anticorps induisant une fluorescence. Ils constatent alors que des capsidies de CPV vides ont la capacité d'aller jusqu'au noyau cellulaire. La capsidie jouent donc un rôle essentiel dans l'infection par CPV en conduisant le virus jusqu'à la membrane nucléaire.

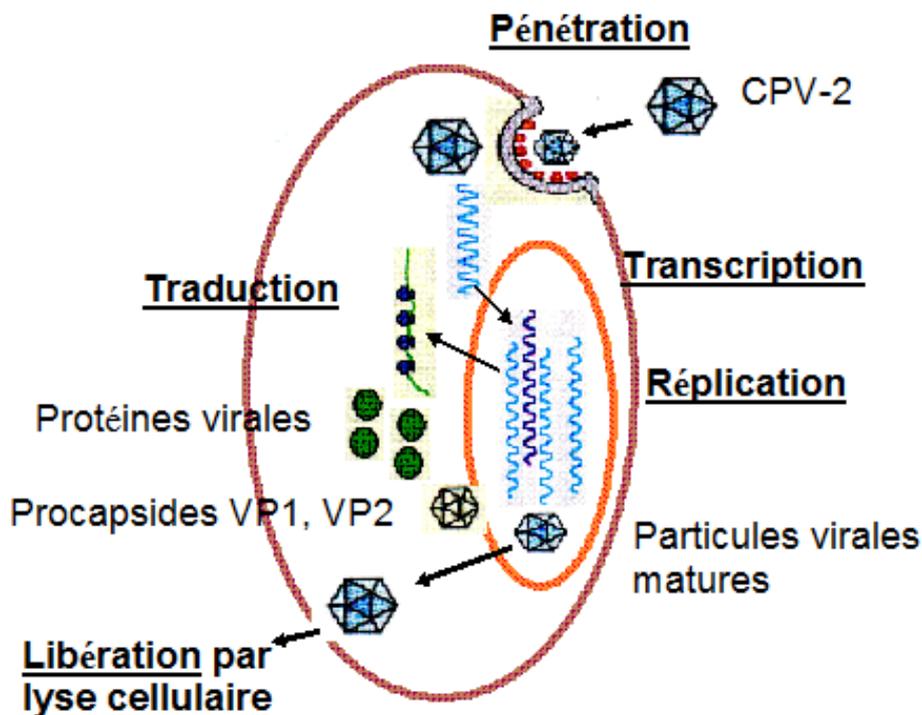
**Figure 9** : Entrée d'un virus par endocytose. D'après **PARKER J et al (2001)**



3. phase d'éclipse : l'ADN est dirigé alors vers le noyau de la cellule et le virus détourne la machine métabolique cellulaire pour produire une à une les différentes molécules essentielles à la formation de nouvelles particules virales efficaces. La séquence N-terminale de la protéine de surface virale VP1 serait responsable de l'entrée de l'ADN et de protéines dans le noyau. Cette séquence N-terminale basique est donc indispensable à la réussite de l'infection cellulaire.

L'ADN du Parvovirus étant monocaténaire, il y a d'abord passage en ADN double brin sous l'effet d'une ADN polymérase fournie par la cellule hôte, puis transcription pour l'obtention des protéines virales (FIGURE 10).

**Figure 10** : Réplication et expression du génome viral.



4. Production de nouveaux virions : Il y a d'abord synthèse de protéines utiles à la réplication, puis les protéines structurales par expression du génome viral mais aussi réplication directe du génome et retour à l'état de simple brin ADN pour la production de génomes viraux fils. Les éléments ainsi formés s'assemblent pour former de nouveaux virus. (FIGURE 10)
5. Excrétion : libération à l'extérieur de la cellule des nouveaux virus par lyse de la cellule hôte.

Les conséquences de la réplication virale pour les cellules sont nombreuses et expliquent la virulence de CPV :

- le cycle viral inhibe les transcriptions et la réplication de l'ADN de la cellule hôte.
- le virus se met en compétition avec la cellule hôte pour l'utilisation de son appareil de traduction et les ARN messagers de l'hôte sont détruits.

- l'excrétion du virus entraîne la lyse de la cellule hôte.

**LALHAINEN T *et al* (2009)** ont réalisé une étude utilisant les dernières technologies moléculaires pour tenter de comprendre les modifications intranucléaires imposées par les virus à la cellule hôte lors de la réplication virale en prenant comme modèle le parvovirus canin. La technique FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) a permis de mettre en évidence une marginalisation de la chromatine de l'hôte, une modification des propriétés des protéines (histones) et de l'environnement nucléaire conduisant à une augmentation de la mobilité des protéines et à une déplétion de l'attraction entre les chromosomes afin de favoriser la réplication virale et l'hybridation de son ADN.

##### 5. Mécanismes de l'immunité face au parvovirus canin

**NELSON C *et al* en 2007** étudient les mécanismes complexes entre les anticorps et la capsid du parvovirus canin. Le parvovirus peut infecter des cellules de l'hôte même quand des anticorps sont présents. Les anticorps peuvent se lier sans différence d'affinité à deux sites de la capsid : les sites A et B de l'épaule. Ils se fixent aux virions à différentes étapes du cycle viral en agrégeant les virions, en empêchant leur liaison aux membranes des cellules, en bloquant les récepteurs présents à la surface des cellules (TfR) par une modification de leur conformation. Enfin, la phagocytose, l'opsonisation et la mort cellulaire programmée sont autant de mécanismes qui luttent contre l'infection. Au cours de l'évolution du parvovirus, certains sites de fixation des anticorps ont été protégés mais d'autres ont subi des mutations, créant de nouveaux sites antigéniques spécifiques (CPV-2a, 2b, 2c). Environ 20 résidus de la protéine VP2 se situant à l'extrémité N-terminale font protrusion à l'extérieur de la capsid et sont clivés par des protéases de l'hôte pour former VP3, site de fixation des anticorps. Ce site a évolué depuis l'apparition du parvovirus et ne se situe pas exactement au même emplacement chez CPV-2 et CPV-2a, 2b, 2c. Les IGgs neutralisent le virus par l'intermédiaire des fragments « Fab » formés de la chaîne légère et d'une partie de la chaîne lourde des anticorps. Certains ont un fort pouvoir neutralisant et d'autres n'ont aucune action. Le pouvoir neutralisant semble dépendre du site de fixation (site B de VP2 plus neutralisant que A), du stade du cycle viral lors duquel le fragment se fixe et de l'interaction avec le récepteur TfR de la cellule hôte. Ainsi, il faut minimum 6 Fabs (sur 25 possibles) sur une capsid pour bloquer la liaison d'un virus avec un récepteur TfR. (FIGURES 7 et 8) Le faible nombre de sites permettant une forte neutralisation et le nombre important d'anticorps nécessaires expliquent que le virus se

développe facilement chez des sujets dont l'immunité est basse. De telles études sont essentielles pour la création de vaccins toujours plus performants.

## 6. Principales différences avec les autres Parvovirus

- Comparaison avec le FPV

Le virus de la panleucopénie féline contamine uniquement les chats et les félinés sauvages (tigres, panthères, léopards, lynx) sauf les lions qui semblent être immunisés naturellement.

Il touche un type cellulaire particulier : les cellules de Purkinje du cervelet du chaton, provoquant alors une hypoplasie de cervelet et une ataxie qui ne sont pas décrits avec CPV-2. La moëlle osseuse est aussi très affectée et la leucopénie marquée, associées à une entérite avec des diarrhées rarement hémorragiques contrairement au CPV-2. La transmission verticale est possible pour ce virus. A la fois la fixation aux cellules est similaire à celle de CPV-2, mais le PH de fixation diffère légèrement. **HUEFFER K *et al* (2003).**

- Comparaison avec le parvovirus humain

Le premier parvovirus découvert en 1960 est le parvovirus humain B19 qui comporte trois souches dont les génotypes 1, 2 et 3 ont été séquencés. Les génotypes 1 et 2 sont les plus fréquents et le génotype 3 semble être surtout rencontré en Afrique et au Brésil. Les mutations sont fréquentes et engendrent l'apparition de nouveaux sous-types, tout comme le parvovirus canin. Des études ont montré qu'un même individu peut être infecté par deux souches différentes de parvovirus humain, comme il semble être le cas pour le parvovirus canin. La recherche du virus est réalisée principalement par PCR. Des fragments d'ADN peuvent être retrouvés durant toute la vie de l'individu guéri. Ce virus engendre un syndrome fébrile et un exanthème chez l'enfant, une arthropathie chez l'adulte et peut entraîner la mort chez les sujets immunodéprimés. Le tableau clinique reste varié avec des symptômes neurologiques, cardiaques, hépatiques et hématologiques. Chez les femmes enceintes, une mort fœtale est constatée. Des études sont réalisées pour développer un vaccin. **SCHNEIDER B *et al* (2008).**

Un nouveau parvovirus humain PARV4 est découvert en 2005 dans le sang et le foie de patients ayant comme symptômes un syndrome fébrile. La diversification des souches de parvovirus chez l'homme montre encore une fois que ce virus ADN simple brin normalement stable a une capacité

d'évolution rapide. **LAU S *et al* (2008)** mettent en évidence la similitude génétique entre PARV4 (63% identiques) et PHoV du porc et BHoV bovin découverts eux aussi récemment à Hong Kong. Ces trois virus seraient très distincts des autres genres et un nouveau genre au sein de la sous-famille des Parvovirinae pourrait être créé : les *Hokovirus*.

- Comparaison avec les parvovirus des animaux de rente

Peu d'attention était accordée au parvovirus dans les troupeaux car BPV, découvert en 1961, s'exprime rarement de manière pathogène chez les bovins. Cependant, des études récentes ont montré un portage important aux Etats-Unis, de l'ordre de 80% des troupeaux adultes infectés par BPV. **SANDALS D *et al* (1995)**. Les principaux symptômes engendrés par BPV2 sont des diarrhées et entérites néonatales chez les veaux privés de colostrum ainsi que des troubles respiratoires lors de surinfections. Des avortements et des momifications embryonnaires sont constatés lors d'infections *in utero* par BPV3 au cours des trois premiers mois de gestation chez les vaches.

De même chez les porcs, le parvovirus PPV est connu pour engendrer une immunosuppression chronique et favoriser l'apparition de maladies opportunistes et d'avortements, mais il cause rarement des symptômes à lui seul. PPV est présent de manière endémique dans les élevages porcins malgré une vaccination respectée. Il existe des souches peu pathogènes majoritaires et des souches très pathogènes qui causent des dermatites chez les jeunes et des troubles de la fertilité ou des avortements lors d'infection avant 70 jours de gestation. Comme pour CPV, les souches sont différentes en fonction de la région du monde que l'on considère. Le vaccin est réalisé à partir d'une souche non pathogène (PPV-NADL-2). **ZEEUW *et al* (2007)**.

Deux autres types de parvovirus porcins (PHoV) et bovins (BHoV), appartenant au nouveau genre des *hokovirus*, ont été récemment identifiés. En 2006, *Streptococcus suis* a engendré une épidémie de PPRSV en Chine favorisée par une infection de PHoV. **LAU S *et al* (2008)**.

Ainsi, les parvovirus des animaux de rente ont peu de similitudes avec le parvovirus canin. Les nouvelles souches détectées semblent encore plus éloignées des souches de CPV-2 et formeraient même un nouveau genre.

- Transmission verticale : CPV-2, une exception

De nombreux Parvovirus peuvent passer la barrière placentaire et atteindre le fœtus contrairement à CPV-2. La transmission verticale existe, par exemple, pour le parvovirus B19 chez l'homme, qui

entraîne myocardite et anémie fœtale. De même, le parvovirus porcin, entraîne des avortements, la panleucopénie féline provoque avortement et hypoplasie et le virus minute de la souris donne des avortements et des hypoplasies cérébelleuses. Chez les renards, une infection *in utéro* par le FPV engendre aussi avortement, résorption placentaire ou mort fœtale.

### III. EVOLUTION MOLECULAIRE DES SOUS-TYPES

#### 1. Mutations à l'origine des différents sous-types

La clé de l'émergence d'un virus est sa capacité à se répliquer chez un nouvel hôte. Ainsi, on constate que les mutations subies par le parvovirus lui permettent de franchir les barrières d'espèces. Les virus ADN simple brin ont un taux de mutation plus élevé que les doubles brins et le parvovirus présente un taux de mutation équivalent aux virus ARN comme celui de l'influenza aviaire ou encore du VIH. Il existe deux explications au fort taux de mutation de ce virus ADN simple brin : le taux de mutation intrinsèque est élevé et augmenté par la sélection naturelle et les mécanismes de réplication de l'ADN simple brin engendrent plus d'erreurs.

Cependant, la plupart des mutations sont neutres ou n'engendrent aucune modification essentielle. En réalité, les seules mutations capables d'entraîner l'apparition de nouvelles souches sont celles qui concernent le génome codant pour le domaine antigénique du virus sur « l'épaule » de la protéine de capsid VP2.

##### *a. De FPV à CPV-2*

###### *i. Les mutations*

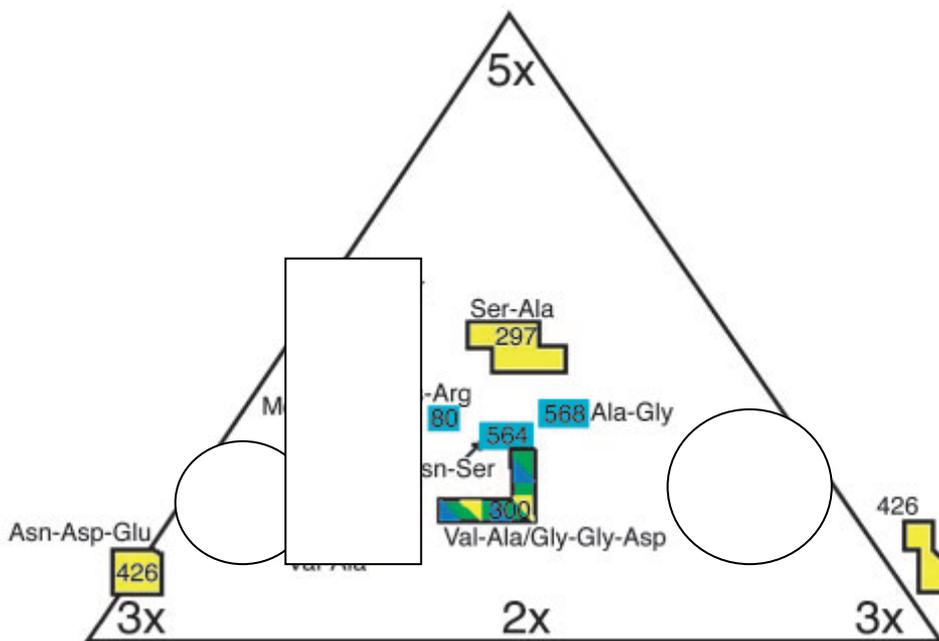
Les mutations concernant CPV-2 montrent comment un virus peut s'adapter et passer les barrières d'espèce grâce à une adaptation moléculaire et un taux de mutation élevé sans recombinaison. En effet, les recombinaisons ne jouent aucun rôle dans l'évolution du parvovirus bien qu'elles permettent normalement de passer rapidement les barrières d'espèce pour d'autres familles virales.

FPV et CPV-2 diffèrent seulement de 6 ou 7 acides aminés dans la séquence de protéines VP1 et VP2, soit moins de 0.5% de différence de nucléotide. (TABLEAU 4). Cependant, cela engendre des différences structurelles et biologiques : FPV infecte uniquement les chats alors que CPV-2 n'infecte que les chiens. En effet, le spectre d'hôte de CPV dépend essentiellement du gène codant pour les protéines de la capsid. Ainsi, CPV-2 infecte uniquement les cellules canines grâce aux acides aminés 93, 103 et 323 de VP2 qui se trouvent dans trois régions de la capsid (FIGURE 11) et permettent la liaison à TfR. A l'inverse, le virus de la panleucopénie féline n'infecte que les chats

car ces acides aminés diffèrent, tout comme les acides aminés 80, 564 et 568 qui contrôlent la capacité de FPV à se répliquer efficacement chez le chat. **SHACKELTON L *et al* (2004)**.

La région du site antigénique sur la capside peut être visualisée et modélisée grâce aux analyses structurales. (FIGURES 3 et 11). Les mutations subies par cette région de la capside sont donc responsables de l'apparition des nouvelles souches et de l'échappement du virus aux anticorps. De plus, l'affinité du virus au récepteur transferrine a augmenté suite à ces mutations et à la sélection positive.

**Figure 11** : Projection d'une unité asymétrique de la capside de CPV montrant la localisation des acides aminés substitués suite aux mutations. Entouré, substitutions de FPLV à CPV-2 ; encadré, substitutions de CPV-2 à CPV-2a. D'après **SHACKELTON L *et al* (2004)**.



## ii. Phylogénie

Suite à l'étude des différences entre FPV et CPV-2, la recherche du lien phylogénétique entre ces deux virus a été explorée.

Une étude menée par **TRUYEN *et al.* en 1998** montre que FPV ne serait pas l'ancêtre de CPV-2. En effet, on pourrait penser que CPV-2 est le descendant direct de FPV aux vues de la protection croisée *in vivo* entre ces deux virus et des anticorps polyclonaux qui prouvent l'existence d'une relation antigénique étroite entre FPV et CPV-2.

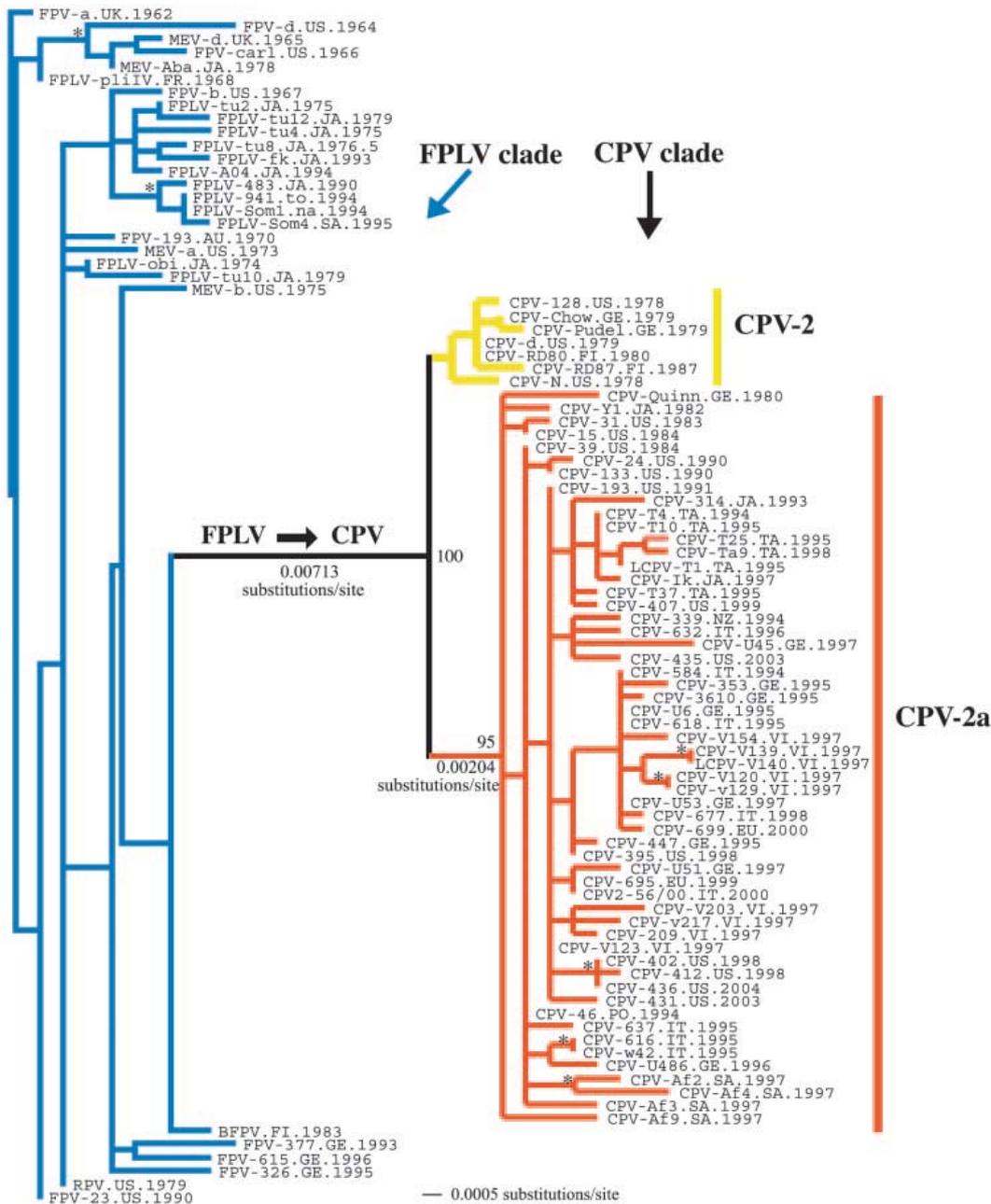
Par l'analyse de la séquence du gène codant pour la protéine de capsid VP2, de trois souches de CPV-2 (Pudell, Chowchow et Quinn) et deux souches de FPV (Panocell et Dohyvac) en Allemagne, on met en évidence des sites de clivage enzymatique communs. Cependant, on constate que peu d'acides-aminés contrôlent la spécificité d'espèce et les différences antigéniques au niveau de VP2. Ce sont surtout les sites 93 (Lys/Asn) et 323(Asp/Asn). Des épreuves à l'aide d'antigènes monoclonaux spécifiques et d'analyses PCR ont alors montré que la phylogénie, calculée par algorithme informatique, ne donne pas de résultats satisfaisants. CPV-2 n'a donc pas pour ancêtre FPV ni même une souche vaccinale de FPV. La trace des premiers virus CPV-2 a été identifiée en Grèce, Belgique et en France chez des renards. Des virus de carnivores de la faune sauvage pourraient donc être les ancêtres de CPV. Une étude a montré que FPV et CPV-2 subissent en moyenne  $7.9 \cdot 10^{-5}$  substitutions par site par an. L'ancêtre commun à ces deux souches subirait, lui,  $2,7 \cdot 10^{-3}$  substitutions par site par an. **SHACKELTON L *et al* en 2004**

De même, **IKEDA Y *et al.* (2002)** rapporte que CPV-1 est encore plus proche génétiquement de CPV-2 et émet l'hypothèse que des espèces de la faune sauvage comme les renards et les visons, pouvant être contaminés par FPV, CPV-1 et CPV-2, pourraient jouer le rôle de réservoir de l'ancêtre commun à tous ces virus.

Ces hypothèses sont confirmées par l'arbre phylogénétique dans une étude de **SHACKELTON L *et al* (2004)**, menée sur des souches récoltées pendant 42 ans. (FIGURE 12). Deux branches distinctes sont visibles sur cet arbre, celle rassemblant le virus de la panleucopénie féline, le virus du vison, le virus du renard bleu (28 membres) et celle correspondant aux différents sous-types mondiaux de CPV-2 et CPV-2a (63 membres). On constate bien que CPV-2 et CPV-2a ont un ancêtre commun non identifié qui les sépare de FPV. Cet ancêtre commun serait apparu 10 ans avant la découverte de CPV-2.

Le renard de l'Arctique (*Alopex lagus*) en Finlande est contaminé par un parvovirus nommé BFPV. Le renard roux européen (*Vulpes vulpes*) ou le renard de l'Arctique pourraient être le réservoir de cet ancêtre commun car des séquences d'acides aminés de VP2 intermédiaires entre FPV et CPV-2 ont été retrouvées dans ces deux espèces en 1983. De plus, la séroprévalence de la parvovirose chez les renards est de 10 à 15% : la transmission inter-espèces entre carnivores sauvages et domestiques est donc possible. La sélection positive est restreinte à quelques sites antigéniques.

**Figure 12** : Arbre phylogénétique de 91 séquences du génome de VP2 chez les carnivores domestiques. D'après SHACKELTON L *et al* (2004).



*Le nom de chaque souche est suivi de l'année de découverte et de la localisation (UK, United Kingdom; US, United States; JA, Japan; FR, France; AU : Australia; FI, Finland; GE, Germany; TA, Taiwan; NZ, New Zealand; VI, Vietnam; EU, Europe)*

*b. De CPV-2 à CPV-2a/2b*

*i. Les mutations*

5 ou 6 acides aminés diffèrent encore entre CPV2 et CPV-2a/2b dans la protéine de capsid VP2, soit 0,2% de variation (TABLEAU 4). Le spectre d'hôte est encore modifié : CPV-2a/2b infecte les chiens et les chats. Cependant, CPV-2a/2b n'ont pas réacquis les séquences de FPV pour l'infection des cellules félines. Les mutations qui permettent la réplication chez le chat concernent les résidus 87, 300 et 305 situés sur « l'épaule » de la capsid (FIGURE 4). Cette région de « l'épaule » contrôle le spectre d'hôtes et la liaison avec le récepteur spécifique des cellules canines. Les autres mutations sont localisées sur deux déterminants neutralisants majeurs (A et B) identifiés sur la protéine VP2 (le site A pour les différences entre CPV-2 et -2a, le site B pour celles entre CPV-2a et -2b). **SPIBEY N *et al.* (2007).**

On constate encore que VP2 étant la protéine de capsid la plus importante, la substitution de quelques acides aminés dans sa structure protéique modifie grandement les propriétés antigéniques du virus : la capacité d'infection et les espèces cibles du parvovirus ont été modifiées suite aux mutations subies par « l'épaule » de VP2. En effet, CPV-2 ne peut infecter les cellules félines. Ceci serait dû à 3 mutations (acides aminés 80, 564 et 568 substitués) sur VP2 et aux différences de 13% entre les récepteurs transferrine félines et canins. Cependant, CPV-2 est capable d'infecter des cellules félines *in vitro*. Un mécanisme encore inconnu doit donc influencer la liaison *in vivo*. CPV-2a et 2b peuvent, eux, infecter les cellules félines et canines car 5 acides aminés (87, 300, 305) de VP2 diffèrent de CPV-2 et confèrent la capacité de liaison aux deux types cellulaires. De plus, la capacité d'infection de CPV-2a et 2b est supérieure à celle de CPV-2 (constante de liaison supérieure et co-récepteur inutile) ce qui explique que ces souches aient remplacé si rapidement CPV-2, aujourd'hui disparu. **HUEFFER K *et al* (2003),**

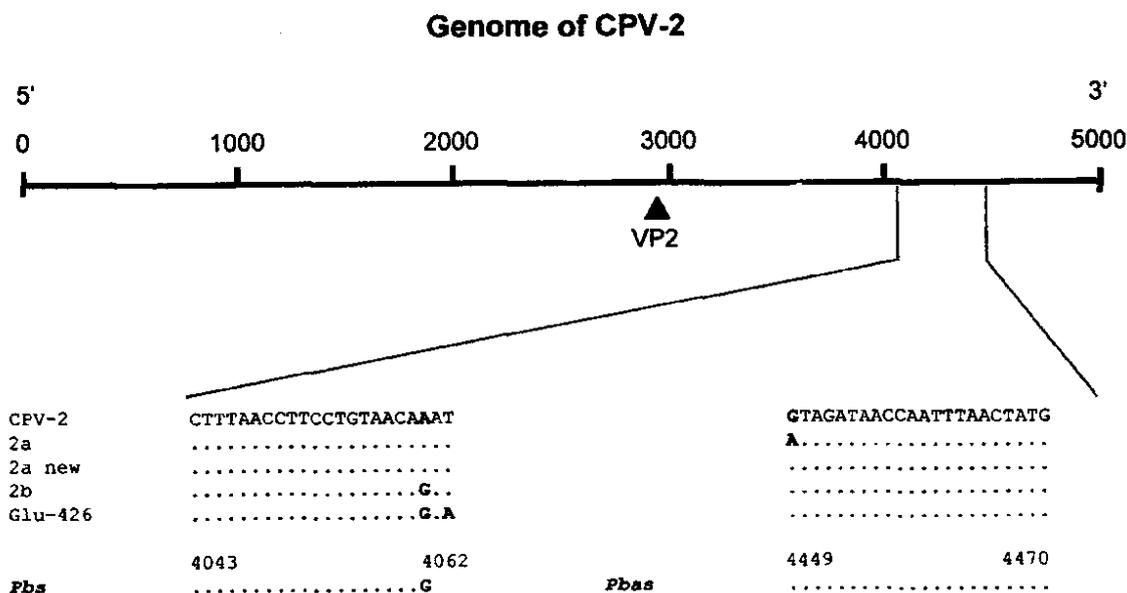
Il suffit donc de peu de mutations pour modifier la structure moléculaire de VP2 et permettre l'infection de différentes espèces et de populations naïves. C'est ainsi que CPV-2a et 2b ont

remplacé CPV-2 dans le monde entier quelques années après leur apparition. Les modifications de la surface virale représentent une adaptation du virus permettant une meilleure réplication dans les cellules hôtes, leur conférant ainsi un avantage sélectif. Cependant ces événements restent rares. **SPIBEY N *et al.* (2007).**

CPV-2a diffère de CPV-2b par 2 acides aminés : en position 426, c'est l'Asparagine pour CPV-2a et l'Aspartate pour CPV-2b ; en position 555 Isoleucine pour CPV-2a et Valine pour CPV-2b. On peut noter que chaque nouveau variant antigénique perd au moins un épitope neutralisant par rapport à la souche précédente.

Une étude récente menée par **OHSIMA T *et al* en 2008** montre qu'actuellement CPV-2a et 2b ne différencieraient plus que par un acide aminé en position 426 (TABLEAU 4). Une mutation en position 555 a eu lieu et donne l'acide aminé Valine aux deux sous-types (FIGURE 13). Ce sont les « nouveaux CPV-2a et 2b » (TABLEAU 4). De plus, le nouveau CPV-2a présente une substitution d'acide aminé en position 297, Sérotonine contre Alanine, sur VP2. Le nouveau CPV-2b présente la même substitution. Cette substitution n'a engendré aucun changement antigénique d'où le nom de « nouveaux CPV-2a et 2b ». Les « nouveaux CPV-2a et CPV-2b », apparus quelques années après l'émergence de ces sous-types, semblent les avoir aujourd'hui en partie remplacés.

**Figure 13** : Représentation schématique du génome de CPV-2 et de ses sous-types CPV-2a/CPV-2b. D'après **MARTELLA V et al (2006)**.



## ii. Phylogénie

Suite à l'étude des différences entre CPV-2 et CPV-2a/2b, la recherche du lien phylogénétique entre ces virus a été étudiée.

Une étude menée par **SHACKELTON L et al en 2004**, tente d'expliquer l'apparition de CPV-2a et la croissance rapide de cette souche virale dans les populations canines et félines. Les génomes de VP2, protéine impliquée dans l'antigénicité, et de NS1, protéine non structurale, sont séquencés et comparés sur des virus FPV, CPV-2 et CPV-2a récoltés sur une période de 37 ans. Des arbres phylogénétiques sont établis. (FIGURE 15). On constate trois parties dans l'arbre phylogénétique : une longue branche sépare CPV de FPV et une autre sépare CPV-2 de CPV-2a. CPV-2 est l'ancêtre de CPV-2a. VP2 et NS1 aurait une fréquence de mutation similaire ce qui permet de mettre en doute l'influence d'une sélection positive pour la virulence qui expliquerait la croissance rapide de CPV-2a. Les mutations sur VP2 semblent être responsables du succès de CPV-2a.

Dans le monde, toutes les souches de CPV-2a/2b ne sont pas identiques à 100%. Il existerait des souches spécifiques de chaque pays. Ces souches dépendraient aussi de l'évolution subie par leur ancêtre CPV-2. Une étude menée par **DOKI M et al. en 2006**, a montré que sur 7 souches de parvovirus isolées de 7 régions différentes du Japon, le génome de VP2 n'était jamais identique. Par

exemple, il semble que toutes les souches asiatiques aient une mutation en position 3675. Cependant, en fonction du type et du nombre de mutation, on peut identifier le virus isolé au type 2a ou 2b. En effet, les séquences génétiques de VP2 montrent 99.8% de similitude avec CPV-2b et les autres montrent 99.4% de gènes identiques à CPV-2a. Un arbre phylogénétique a pu être établi au cours du temps montrant les mutations subies par les différentes souches de CPV en fonction de leur répartition mondiale. (FIGURE 16).

### *c. Apparition de CPV-2c*

Trois types de CPV-2c ont tout d'abord été découverts: CPV-2c(a), CPV-2c(b) et CPV-2c (ou Glu-426).

CPV-2c(a) et CPV-2c(b) proviennent des « nouveaux CPV-2a et 2b » qui ont subi une mutation naturelle sur le génome de VP2 qui code alors en position 300 pour l'acide aminé glycine au lieu de l'asparagine et/ou en position 265 pour la proline qui remplace la thréonine (TABLEAU 4). Cette mutation affecte donc une région antigénique située sous « l'épaule » de VP2. On peut alors distinguer CPV-2a et 2b des 2c(a) et 2c(b) par l'utilisation d'un anticorps monoclonal MaB B4A2. **OHSHIMA T *et al* en 2008.** CPV-2c(a) et 2c(b), autrement appelés mutants Asp-300 n'ont pas la capacité d'infecter les chiens, ce serait une souche uniquement féline retrouvée chez des chats sauvages et domestiques du sud-est asiatique. **MARTELLA V *et al.* (2005).** De plus, ces mutations ponctuelles ne sembleraient pas se répandre depuis leur découverte.

**Tableau 4 :** Séquences d'acides aminés codées par le génome de VP2 renseignant sur la phylogénie des différentes souches de parvovirus. D'après **OSHIMA T *et al* (2008)**

| Virus      | 80  | 87  | 93  | 103 | 232 | 297 | 300 | 305 | 323 | 426 | 555 | 564 | 568 |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| FPLV/MEV-1 | Lys | Met | Lys | Val | Val | Ser | Ala | Asp | Asp | Asn | Val | Asn | Ala |
| MEV-2/BFPV | Lys | Met | Lys | Val | Val | Ser | Val | Asp | Asp | Asn | Val | Asn | Ala |
| CPV-2      | Arg | Met | Asn | Ala | Ile | Ser | Ala | Asp | Asn | Asn | Val | Ser | Gly |
| CPV-2a     | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ser | Gly | Tyr | Asn | Asn | Ile | Ser | Gly |
| CPV-2b     | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ser | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly |
| N CPV-2a   | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly |
| N CPV-2b   | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly |
| CPV-2c     | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Glu | Val | Ser | Gly |
| CPV-2c(a)  | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Asp | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly |
| CPV-2c(b)  | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Asp | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly |

FPLV = Feline panleukopenia virus; MEV = Mink enteritis virus; BFPV = blue fox parvovirus; CPV = Canine parvovirus. N=nouveau

CPV-2c provient d'une variation du « nouveau CPV-2b » qui a subi une mutation du génome de VP2, épitope stratégique de la capsid, remplaçant l'acide aminé Aspartate en position 426 par le Glutamate. Ceci est permis par la substitution du nucléotide T par A à la place 4064 dans le génome de VP2. C'est pour cela que CPV-2c est aussi nommé Glu 426. Cette substitution implique un site antigénique majeur (épitope A) de « l'épaule » de VP2 et modifie donc le pouvoir antigénique. On peut alors distinguer CPV-2a et 2b du 2c par l'utilisation d'un anticorps monoclonal 21C3 générés par **NAKAMURA *et al***. Ce nouveau type, CPV-2c se répand, lui, très rapidement sur la planète et a déjà colonisé tous les continents en moins de 10 ans.

**Figure 14** : Position des nucléotides et des acides aminés de la protéine VP2 chez les différents sous-types de parvovirus. D'après **VIEIRA J et al (2008)**.

| CPV type | Isolate/GenBank no. | Origin/year        | Codon position (amino acid) |           |           |
|----------|---------------------|--------------------|-----------------------------|-----------|-----------|
|          |                     |                    | 426                         | 430 (Leu) | 580 (Pro) |
| 2b       | M74849              | United States/1984 | GAT (Asp)                   | TTG       | CCT       |
|          | DQ340409            | Brazil/1985        | GAT (Asp)                   | TTA       | CCT       |
|          | EU273770            | Portugal/2006      | GAT (Asp)                   | TTA       | CCA       |
|          | EU273772            | Portugal/2006      | GAT (Asp)                   | TTA       | CCA       |
| 2c       | AY380577            | Italy/2000         | GAA (Glu)                   | TTA       | CCA       |
|          | EU273771            | Portugal/2006      | GAA (Glu)                   | TTA       | CCA       |
|          | EU273773            | Portugal/2006      | GAA (Glu)                   | TTA       | CCA       |

Mais il semble exister en réalité de nombreux types de CPV-2c :

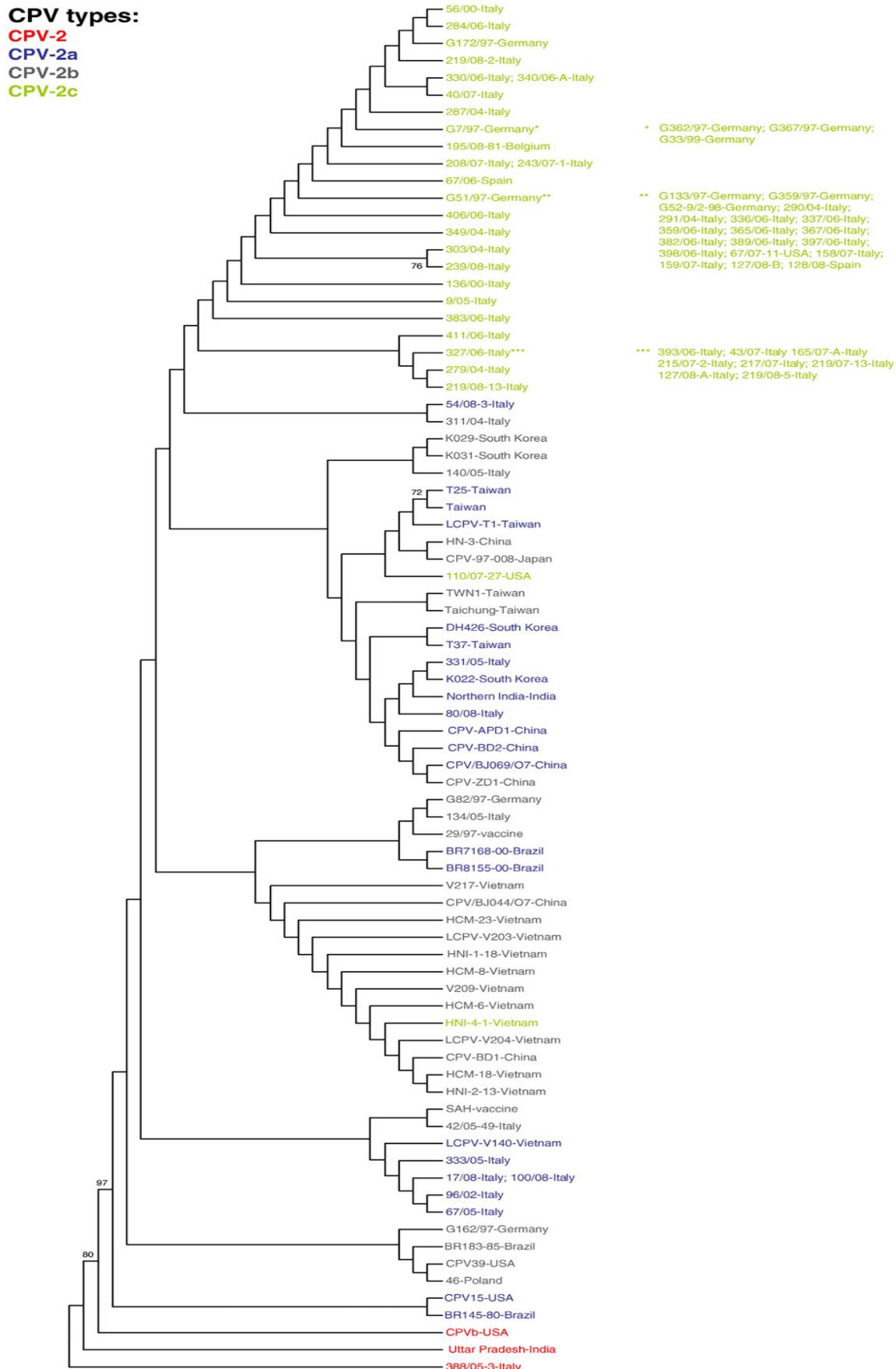
Aux Etats-Unis, en 2007, **HONG C et al.** met en évidence deux mutations supplémentaires des positions 4076 et 4104, cette dernière provoquerait un changement de nucléotide à la position 440 Trh/Ala. Un nouveau vaccin pourrait être créé à partir de ces différentes souches. On peut penser que les 2 types de souches CPV-2c ont évolué indépendamment car elles ont été trouvées, aux Etats-Unis, dans des états éloignés. En Amérique du sud, les types les plus fréquents de CPV-2c sont ceux identiques aux CPV-2c allemand et italien mais des types vietnamiens ayant 99,8% de similitudes ont aussi été retrouvés. Il existerait un type décrit seulement en Uruguay qui présente 99,4% de correspondance avec le type italien. **PEREZ R et al. (2007)**. En Europe, en 2008, **VIEIRA MJ et al.** suppose que toutes les souches de CPV-2c sont identiques à 100% à la souche italienne. (FIGURE 14)

Il faut attendre 2009 pour que **DECARO et al (2009 c)** réalise le séquençage de la protéine de capsid de 58 souches différentes de CPV-2c européennes et de deux souches américaines et montre la phylogénie entre les différentes souches du monde entier (FIGURE 15). L'équipe confirme la mutation Glu-426 qui permet de caractériser le type 2c et répertorie 39 mutations chez CPV-2c dont seulement 10 concernant la protéine de capsid VP2. La mutation 440 est retrouvée chez les souches CPV-2c du monde entier, mais aussi chez des CPV-2a italiennes et indiennes qui continuent d'évoluer. La mutation en position 297 concerne un site antigénique mineur mais serait responsable de la variation antigénique de CPV-2c. Des sites normalement peu exposés aux mutations, comme le résidu 265 qui ne concerne pas la capsid, sont modifiés chez de nombreux CPV-2c. L'arbre phylogénétique construit montre que toutes les souches CPV-2c européennes sont très similaires les unes aux autres. Les souches CPV-2c américaines sont proches des souches européennes. Les souches CPV-2c des autres continents sont dispersées parmi les branches de CPV-

2a et 2b de leur pays, et s'éloignent donc des autres CPV-2c : la souche CPV-2c vietnamienne HNI est très proche de CPV-2b de l'est asiatique. (FIGURE 16)

On comprend que l'évolution de CPV-2c est incroyablement rapide et encore inexplicée car aucune des principales mutations subies par CPV-2c ne permet une sélection positive (codons 13, 300, 426, 440).

**Figure 15** : Arbre phylogénétique construit à partir du génome de la protéine VP2 de 75 souches de CPV-2a, 2b et 2c provenant de différents continents. D'après **DECARO N et al. (2009 c)**.



## 2. Caractéristiques moléculaires spécifiques au sous-type 2c

Les caractéristiques moléculaires de CPV-2c sont encore en cours d'étude mais pourraient expliquer cette capacité d'évolution et de propagation si rapide. La mutation de la protéine de capsidite pourrait permettre une transmission encore plus rapide du parvovirus **DECARO et al. (2005)**.

On a constaté que CPV-2c infecte moins facilement les cellules canines mais semble plus résistant dans l'environnement

De plus, CPV-2c peu infecter les chats facilement ce qui accroît sa propagation.

Les mutations à l'origine de CPV-2c ne semblent pas avoir eu de conséquences sur les sites de fixation des anticorps neutralisants majeurs (site B de VP2) ni sur les sites de liaison du virus aux récepteurs transferrine (TfR) situés sur les cellules hôtes. Les mécanismes de défense immunitaire et d'infection cellulaire sont donc identiques, **NELSON C et al (2007)**.

Il semblerait que CPV-2c ait été retrouvé en co-infection avec le coronavirus. La question d'une potentialisation de la pathogénicité lors de co-infection se pose alors. En effet, chez ces animaux des symptômes digestifs et respiratoires sont constatés.



## IV. EPIDEMIOLOGIE DU PARVOVIRUS CANIN ET DE SES SOUS-TYPES

### 1. Répartition mondiale

Le parvovirus circule aujourd'hui de façon enzootique dans le monde entier mais la répartition de ses souches est hétérogène.

#### *a. Dans le monde*

Le type initial du Parvovirus canin (CPV-2) s'était répandu en quelques mois en 1978 dans la plupart des régions du monde sauf en Australie, île isolée. La rapidité de sa diffusion s'expliquant par sa résistance élevée, la facilité de sa transmission oro-fécale, et surtout l'absence d'immunité acquise dans les populations canines. Ainsi, FPV et CPV-2 avaient une répartition mondiale mais aujourd'hui, CPV-2a, 2b et 2c les ont remplacés.

Les études réalisées sur les différents continents ont montré que la prévalence de CPV-2b se maintient en dessous de 20% dans le monde. Cependant, CPV-2b est majoritaire aux Etats-Unis, à Taiwan et au Japon alors que CPV-2a est majoritaire en Europe. La prédominance de souches différentes s'explique par la variété des mutations constatées en fonction de la répartition géographique. En effet, aux Etats-Unis, le 297<sup>e</sup> acide-aminé de VP2 est la Sérotonine alors que le génome code pour de l'Alanine au Japon, en Allemagne et à Taiwan. On parle donc de souches américaines ou de souches asiatiques. **DOKI M *et al.* (2006).**

Aux Etats Unis et au Canada, CPV-2 disparaît dès 1983. CPV-2b est majoritaire, contrairement au reste des continents. En effet, en 1991, une étude rapportée par **DOKI M *et al.* (2006)** montre que 70 à 80 % des isolats correspondaient au type CPV-2b, contre 20 à 30% pour le CPV-2a.

CPV-2c est découvert au Etats-Unis en 2005. Au moins 5 états sont touchés par CPV-2c depuis 2006: Arizona, Californie, Georgie, Oklahoma, et Texas.

En Asie, les proportions de CPV-2a et 2b varient d'un pays à l'autre. CPV-2a est majoritaire en Corée à 95% et est la cause de nombreuses infections dans la population canine. CPV-2a et 2b sont très présents chez les chats dans tout le sud-est asiatique, en proportions égales.

Deux nouvelles souches de parvovirus sont découvertes par **IKEDA *et al* en 2000**: CPV-2c(a) et CPV-2c(b), autrement appelées Asp-300, isolées de Léopards au Vietnam et de chiens en Corée. Ces souches resteront confinées en Asie.

CPV-2c est isolé pour la première fois en Asie au Vietnam en 2004 par **NAKAMURA *et al.***

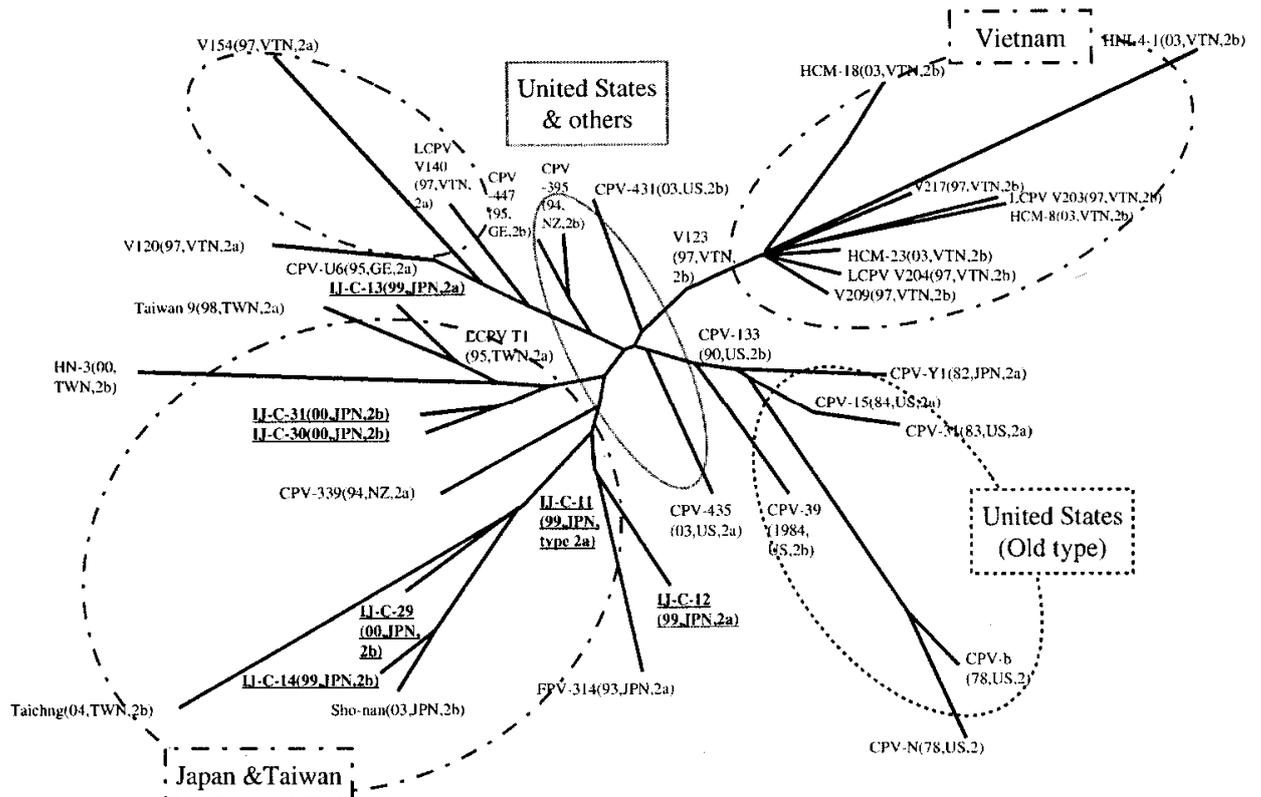
Au Japon, les « nouveaux CPV-2b et CPV-2a » ont remplacé CPV-2a et 2b. CPV-2c n'a pas encore été détecté ou bien il ne cause pas un tableau clinique typique et n'a donc pas encore été recherché.

**OHSHIMA T *et al* (2008)**

En Australie, CPV-2a reste la souche majoritaire mais CPV-2c se répand tandis que CPV-2b tend à disparaître. **MEERS M *et al.* (2007)**

En Amérique du Sud, CPV-2a, 2b et 2c, cohabitent depuis 2003. **CALDERON MG *et al.* (2009)** montrent que CPV-2c devient majoritaire par rapport aux deux autres souches en Argentine. De même, **PEREZ R *et al.* (2007)** met en évidence la domination de CPV-2c par rapport aux deux autres souches dans plusieurs régions d'Amérique du Sud.

**Figure 16** : Arbre phylogénétique construit à partir du génome de la protéine VP2 des souches de CPV en fonction de leur répartition mondiale. D'après **DOKI M *et al.* (2006)**.



*b. En Europe*

CPV-2a remplace rapidement CPV-2 mais la progression de CPV-2b fut plus lente en Europe que sur les autres continents. CPV-2a et 2b sont ensuite présents en proportions équivalentes à la même période dans plusieurs pays européens. Cependant, CPV-2b est en règle générale minoritaire en Europe avec une prévalence de 20% environ. **GANIÈRE *et al.* en 2000**

En Italie, de nombreuses études sont menées sur le parvovirus canin. Aujourd'hui, CPV-2a domine dans ce pays et CPV-2c semble remplacer progressivement CPV-2b, d'après une étude menée au cours des 3 dernières années par **DECARO N *et al.* (2005)**. En effet, sur 68 isolats de parvovirus récoltés en 2005 en Italie, 38% étaient des CPV-2a, 26% des CPV-2b et 35% des CPV-2c.

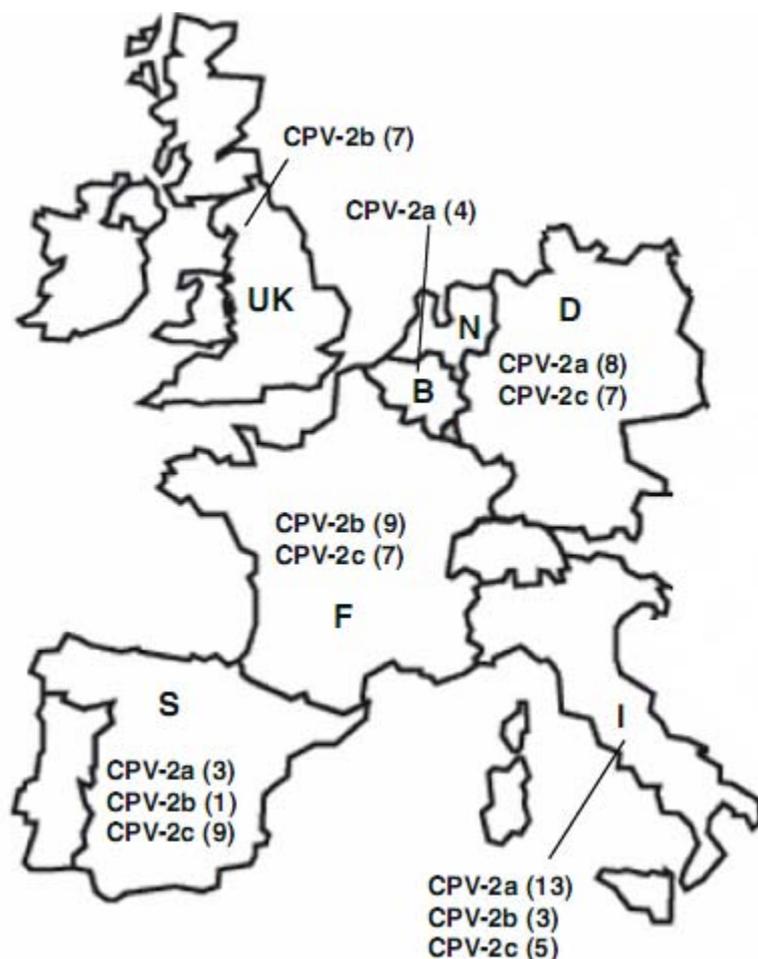
En Espagne, CPV-2a complètement disparu depuis 1990. CPV-2a est prévalent car il représente environ 60% des isolats. CPV-2c remplace CPV-2b qui est de moins en moins souvent isolé. **DECARO N *et al.* (2005)**. L'évolution du parvovirus au Portugal est similaire.

En Allemagne, CPV-2 disparaît rapidement et il semble que la proportion de CPV-2a et 2b soit équivalente dans les années 90 puis la prévalence de CPV-2b diminue. CPV-2c est isolé en 2007. **DECARO N *et al.* (2008)**

En Grande-Bretagne, CPV-2a est largement majoritaire dès 1980 (87%). CPV-2c est isolé en 2007 et remplacerait rapidement CPV-2b.

La dernière étude publiée en 2009 par **DECARO *et al.* (2009 b)** est réalisée sur 156 échantillons fécaux provenant de différents pays d'Europe de l'ouest. 133 échantillons proviennent de chiots âgés de moins de 3 mois et 33 proviennent de chiens de plus d'un an. L'on constate alors (FIGURE 17) que CPV-2 a maintenant disparu en Europe. CPV-2a et 2b sont largement prédominants aux Royaume-Unis et en Belgique. CPV-2c est prédominant en Italie et en Allemagne et très fréquent en Espagne et en France.

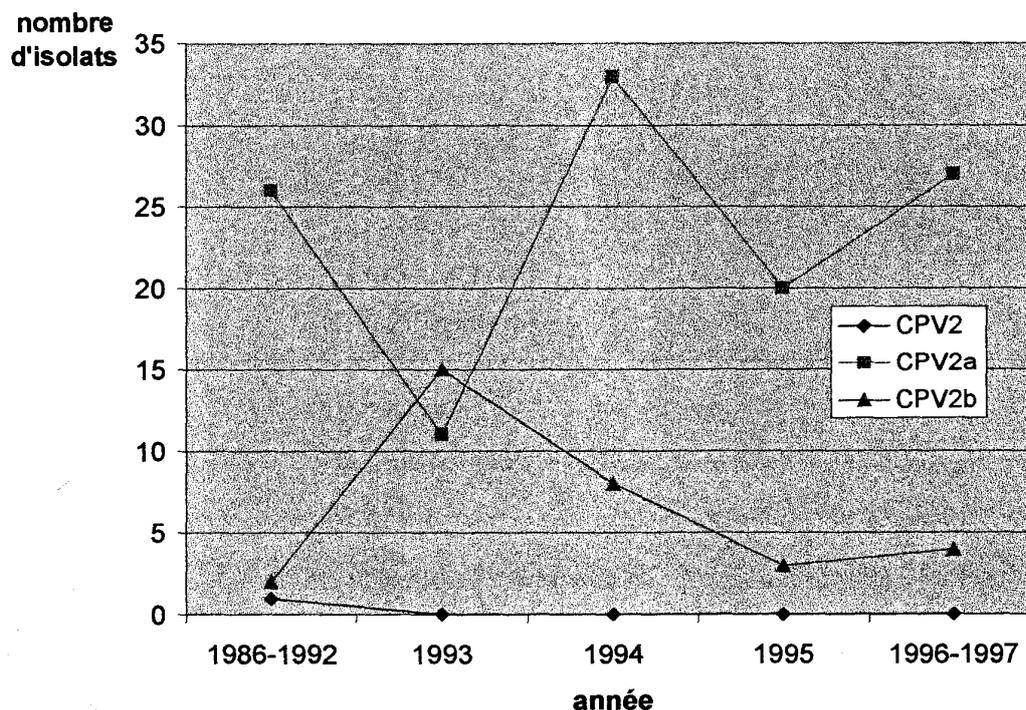
**Figure 17** : Distribution géographique du parvovirus canin en Europe de l'ouest (nombre de souches identifiées entre parenthèses). D'après **DECARO N *et al* (2009 b)**



*c. En France*

Depuis 1994, le type CPV-2a, présent dans plus de 80 % des échantillons, apparaît le plus commun. Entre 1986 et 1997, une étude menée par **GANIÈRE *et al.* (2000)** sur 150 échantillons fécaux de chiots suspects de parvovirose, évalue la proportion de chacun des types de parvovirus en France. Le diagnostic est confirmé par hémagglutination ou par test ELISA. On constate alors que CPV-2 disparaît avec un seul échantillon récolté, soit un taux de 0,7%. CPV-2a, lui, prédomine avec 78% des isolats et CPV-2b reste minoritaire avec 21,3% des isolats. De plus, l'étude montre que la prévalence de CPV-2b diminue dès 1993 et que CPV-2a reste toujours majoritaire. (FIGURE 18). En effet, la proportion CPV-2a/2b en 2001 est de 75% contre 25%.

**Figure 18** : Evolution des types de parvovirus en France de 1993 à 1997. D'après **GANIÈRE et al.** (2000).



**DECARO et al. (2009 b)** publie une étude sur la répartition du parvovirus en Europe de l'ouest (FIGURE 17) à partir de 156 échantillons fécaux dont 26 proviennent de France. Il montre alors que CPV-2c représente un fort taux de parvovirus en France : 7 échantillons / 16 se sont révélés être la souche CPV-2c, soit 44% de prévalence. Cependant, le nombre d'échantillons analysé est restreint. D'autres études sont en cours en France pour évaluer plus précisément la prévalence de CPV-2c.

## 2. Epidémiologie du parvovirus canin

### a. *Source de contamination*

La source de contamination principale est constituée par les chiens et chats malades qui excrètent principalement le virus dans leurs fèces mais aussi sur leur fourrure par le biais du léchage. Les urines et la salive peuvent aussi contenir des particules infectieuses mais en quantité moindre que

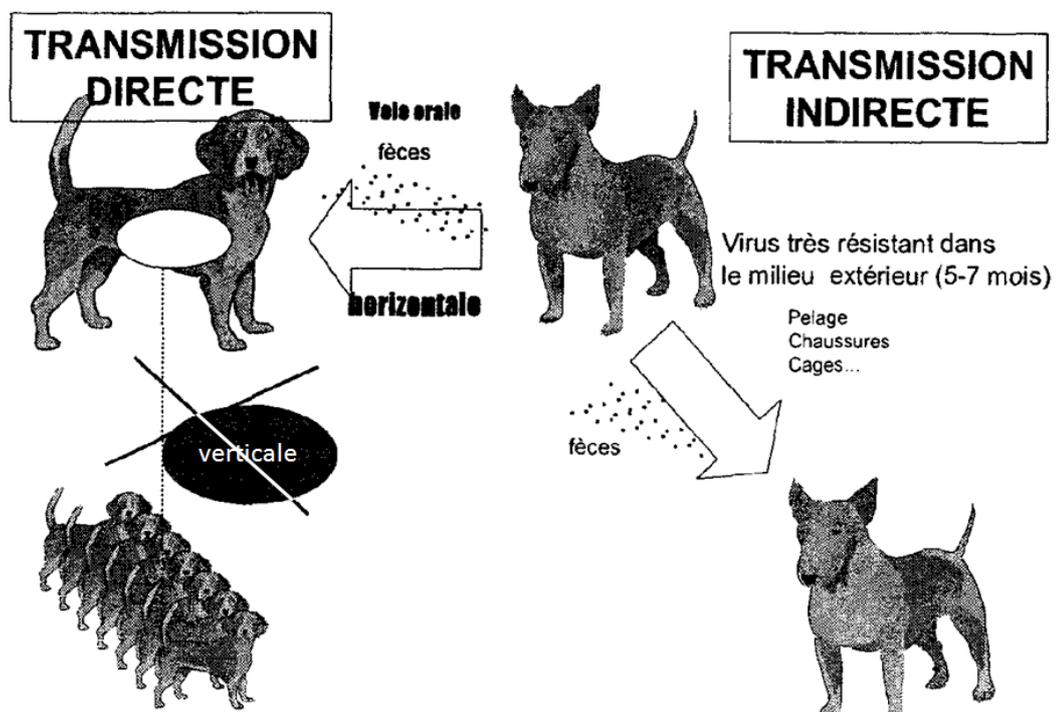
les fèces. Les animaux récemment infectés asymptomatiques excrètent également le virus et représentent une deuxième source de contamination.

Les contaminations sont souvent indirectes, à partir d'objets ou de lieux souillés, sans nécessité de contact étroit. Il faut donc se méfier du matériel d'élevage ou du matériel vétérinaire. L'infection virale a une vitesse de transmission rapide.

Les insectes et les rongeurs peuvent représenter des vecteurs du parvovirus canin et contribuer à la dissémination du virus. De même, les humains (éleveurs, vétérinaires, visiteurs d'élevage) peuvent disséminer le virus.

*b. Transmission*

**Figure 19** : Modes de transmission. D'après **Polycopié de Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (2006/2007)**



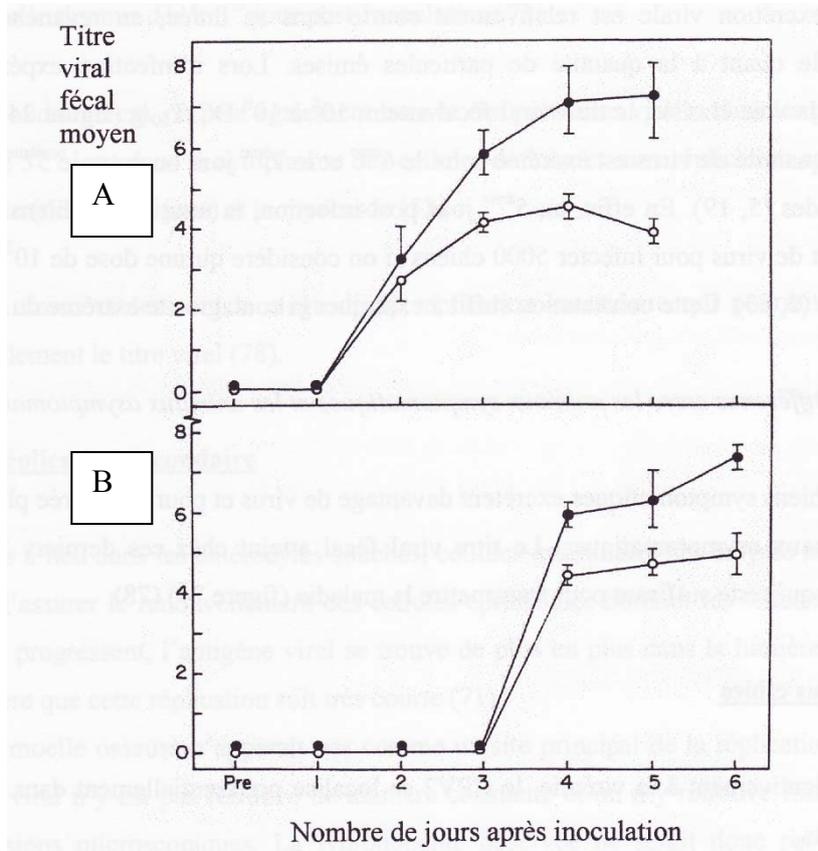
La transmission horizontale se fait d'un chien infecté à un chien sain par voie oro-fécale. **IKEDA Y et al. (2002)**. La transmission verticale est extrêmement rare car le virus ne passe pas la barrière placentaire.

La transmission indirecte se fait par l'intermédiaire de la diarrhée profuse émise qui est très contaminante : un animal excrète dans ses selles  $10^8$  à  $10^{11}$  particules virales par jour. (FIGURE 19). On constate que l'excrétion commence 3 jours post-infection, quand la virémie est intense, et qu'elle est maximale au 6<sup>e</sup> jour post-infection. (FIGURE 20)

Les chiens guéris excrètent encore 14 jours après disparition des symptômes. Ils risquent donc encore de contaminer d'autres animaux.

Chez le chat, le parvovirus persiste jusqu'à 50 semaines dans les poumons et dans les reins. Les chats semblent donc excréter le virus plus longtemps que les chiens.

**Figure 20:** Moyenne des titres fécaux exprimés en log10. Schémas A : chiens infectés par voie veineuse. Schémas B : chiens infectés par voie orale. D'après **MEUNIER P (1985)**



CPV-2a et 2b étant plus virulents, on a constaté expérimentalement une période d'incubation plus courte (4 à 5 jours au lieu de 5 à 8 jours avec le CPV-2), une excrétion virale plus importante dans les selles, et une réponse sérologique marquée par un titre en anticorps neutralisants ou inhibant l'hémagglutination 2 à 4 fois plus élevé **CARMICHAEL L et al. (1994)**. On retiendra que CPV-2a et 2b sont contagieux pendant 18 à 25 j après l'infection.

### *c. Sensibilité des espèces*

Les hôtes du parvovirus ont évolué au cours du temps en fonction des mutations survenues.

CPV-2 était restreint aux canidés et en 1980 il est retrouvé dans les populations de coyotes aux Etats-Unis ainsi que chez des dingos en Allemagne et des renards gris en Asie. Aujourd'hui encore, **ALMBERG E et al. (2009)** met en évidence la présence enzootique de CPV dans les populations de loups et de coyotes nouvellement introduites dans le parc National de Yellowstone aux Etats-Unis. Chez les loups, la séroprévalence est de 100% et chez les coyotes, de 94% d'après un dépistage sur sérum par inhibition de l'hémagglutination. Cependant, CPV serait fatal uniquement chez les jeunes animaux déjà immunodéprimés.

Ainsi, les espèces sensibles naturellement à CPV-2 sont les canidés (le chien, le coyote, le loup, le renard). Les espèces sensibles expérimentalement, par voie parentérale uniquement sont le chat, le furet et le vison. CPV-2 aurait même été retrouvé chez un castor et un porc-épic aux Etats-Unis. **STEINEL A et al. (2001)**

CPV-2a et 2b touchent les chiens, les chats et les félins sauvages. En effet, 5% de la population féline domestique serait victime de CPV-2a ou 2b. Cependant, une étude de **NAKAMURA K et al. (2001)** au Japon montre que les chats seraient peu sensibles à CPV-2a et 2b qui se multiplient peu et engendre rarement des signes cliniques. CPV-2a et 2b touchent des félinidés dans les zoos du monde entier : CPV-2a a été isolé d'un tigre de Sibérie dans un zoo allemand, des chats sauvages souffraient d'infection due à CPV-2a aux Etats-Unis, des léopards (*Felis bengalis*) ont présenté une infection à CPV-2b à Taiwan et au Vietnam et des guépards ont été infectés. **IKEDA Y et al. (2002)**. (TABLEAU 5)

**Tableau 5:** Sensibilité des espèces

| <b>VIRUS</b> | <b>ESPECES CIBLES</b>  |
|--------------|--|
| FPV          | Félinés (chat, léopard, lion, tigre, panthère),<br>Mustélidés (vison, furet), Procyonidés (raton-laveur) |
| CPV-2        | Chien  |
| CPV-2a/2b    | Chien<br>Félinés (chat, léopard, lion, tigre, panthère),   |
| CPV-2c       | Chat et chien  |

Des anticorps anti-parvovirus n'ont jamais été mis en évidence chez les humains exposés de manière fréquente et intense à la parvovirose. Le parvovirus ne présente donc aucun danger pour l'homme.

*d. Voies de pénétration:*

La voie de pénétration principale est la voie orale. L'étape initiale obligatoire est donc l'ingestion de particules virales. On considère que  $10^2$  DCIT 50 (dose infectieuse 50% sur culture cellulaire) sont suffisants pour transmettre l'infection.

La voie de pénétration parentérale est fréquemment utilisée expérimentalement. La virémie, l'excrétion et l'apparition des symptômes sont alors avancées de 24 à 48h.

*e. Réceptivité*

Lors de la première épidémie de parvovirus, la réceptivité était totale chez les adultes comme chez les jeunes. Jusqu'à présent, les animaux adultes étaient pour la plupart immunisés par le biais de la vaccination et les cas cliniques se retrouvaient donc chez les chiots ou les chatons en période critique. Avec CPV-2c, même les adultes vaccinés sont infectés.

Plusieurs facteurs favorisant la sensibilité au parvovirus ont été identifiés :

- L'âge : plus le chiot est jeune, plus la maladie est sévère. En effet, les symptômes diffèrent en fonction de l'âge de l'animal car le virus se réplique seulement pendant la phase S du cycle cellulaire. Les cellules en constante réplication sont donc les plus touchées et sont les plus nombreuses chez les jeunes : l'index mitotique des entérocytes des cryptes intestinales est le plus élevé à 2 mois. La plupart des victimes ont entre 6 semaines et 6 mois ;
- La vitesse de croissance : plus le chiot se développe vite, plus tôt il perd ses anticorps. En effet, le déclin des anticorps maternels, qui n'assurent plus une protection passive mais empêchent une vaccination efficace, permet l'infection ;
- Les maladies concomitantes comme le parasitisme intestinal, une salmonellose ou une clostridiose, aggravent les symptômes digestifs;
- La race : les chiens de race sont plus exposés que les croisés, et certaines races semblent plus sensibles, comme le Doberman et le Rottweiler. Une immunodéficiência héritée chez le Rottweiler et la prévalence élevée de la maladie de Von Willebrand chez ces deux races seraient mises en cause. **HOUSTON et al. (1996)**
- Le sexe : une étude menée par **HOUSTON et al. (1996)** montre que les mâles non castrés présenteraient un risque plus élevé d'être infectés par le parvovirus. Le vagabondage de ces chiens pourrait expliquer ces résultats.
- Le stress inhérent chez certains chiots serait également mis en cause.

La réceptivité varie donc en fonction des souches, de la localisation, de l'âge, de l'état de santé et des hôtes concernés.

On peut encore tenir compte de facteurs extrinsèques comme la période de l'année : L'été, durant les mois de juin, juillet, août, un pic de nombre de cas de parvovirus est constaté. De plus, on note un décalage de 4 à 6 mois entre les périodes de saillie et les pics de cas de parvovirus. La vaccination influe évidemment sur le risque d'infection par le parvovirus : une étude menée de 1982 à 1991 par **HOUSTON et al. (1996)** montre qu'un chien non vacciné a 12.7 fois plus de chances d'être atteint de parvovirose. Les chiens vivant en collectivité ou menés dans les salons canins sont plus exposés à la maladie.

### *f. Morbidité et mortalité*

Pendant l'épidémie engendrée par la maladie, la morbidité était de 50% et la mortalité atteignait 50 à 100%. Aujourd'hui, le taux de mortalité est de 10% chez les chiots de 12 semaines et de 1% chez l'adulte quand la maladie est traitée. La guérison ou la mort surviennent dans un délai de 1 à 5 jours après l'infection.

Les différentes souches de parvovirus canin ne présentent pas le même taux de morbidité et de mortalité. En effet, on a constaté une évolution de la pathogénicité des souches au cours du temps, mais aussi une différence entre les souches présentes dans les multiples pays où est étudiée cette maladie. Par exemple, **MOON H et al en 2008** montre, suite à une l'inoculation des différentes souches Coréennes CPV-2a I, 2a V et 2b présentes dans la population canine, que les souches 2a sont plus pathogènes et engendrent une létalité supérieure (60 à 80%) aux souches 2b (20%). Cependant, il n'y a aucune différence significative de pathogénicité entre les deux sous-types de CPV-2a ( $p=0,1$ ).

De même, la pathogénicité des différentes souches décrite dans les articles américains ou européens est souvent inversée : une souche plus pathogène sur un continent va engendrer les symptômes les moins graves sur l'autre continent. Chaque continent et même chaque pays a des souches caractéristiques (FIGURE 17), engendrant une morbidité et une mortalité différentes.

### 3. Particularité épidémiologique de CPV-2c

#### *a. Transmission*

La principale voie de transmission est toujours oro-fécale. Il semble cependant que CPV-2c soit contagieux plus longtemps car il reste un grand nombre de particules virales dans les selles au bout de 45j. De plus, des études ont montré que la mutation augmente la stabilité du virus dans l'environnement. **NAKAMURA et al. (2003)**.

La mutation de Glu-426 faciliterait sa transmission.

### *b. Réceptivité*

CPV-2c peut infecter les canidés mais aussi les félidés domestiques et sauvages tels les léopards. CPV-2c infecterait plus de chats que CPV-2a/2b et induirait systématiquement des symptômes plus importants. **IKEDA Y *et al.* (2002).**

Il semblerait que les animaux adultes soient plus réceptifs à CPV-2c comparé aux autres souches qui touchent plutôt les jeunes. **NAKAMURA K *et al.* (2001).**

### *c. Infectiosité*

**VIEIRA MJ *et al.* (2008)** ont mis en évidence la possibilité d'une co-infection CPV-2b/2c. En effet, des analyses PCR ont été effectuées sur quatre portées de chiots atteints de parvovirose au Portugal, et ont révélé deux portées atteintes par CPV-2b, une atteinte par CPV-2c et une portée présentant les deux types de souches : CPV-2b et 2c chez chaque chiot après différentes techniques d'analyse donnant toutes ce même résultat. Un résultat identique a été mis en évidence chez un chat. Cela montre l'évolution rapide du parvovirus et les difficultés qui peuvent se poser concernant les tests diagnostics et les vaccins.

### *d. Morbidité et mortalité*

La morbidité et la mortalité semblent plus élevées pour CPV-2c que pour les autres souches. Un plan d'alerte a été déclenché aux Etats-Unis depuis 2005. En Amérique du sud, la mortalité serait aussi élevée. Il semblerait que la pathogénicité de CPV-2c chez le chat soit entre celle de FPV, très pathogène, et celle de CPV-2a/2b, presque asymptomatiques.

En Italie, au contraire, il semble que la mortalité soit inférieure avec CPV-2c **DECARO N *et al.* (2005).**

## **CONCLUSION:**

L'étude de l'évolution génétique de CPV-2, de son passé épidémiologique et de sa répartition géographique permet d'expliquer et de prévoir l'évolution des autres souches CPV-2a, CPV-2b et CPV-2c qui cohabitent aujourd'hui. Les méthodes diagnostic et les futures stratégies prophylactiques dépendent de ces découvertes.

## **DEUXIEME PARTIE:**

### **Physiopathogénie et méthodes de diagnostic des différentes souches du Parvovirus canin**



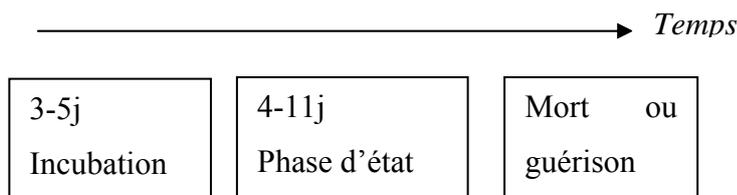
# I. PATHOGENICITE ET FORMES CLINIQUES

## 1. Physiopathogénie

### a. *Etapas de l'infection*

On différencie trois étapes :

- la durée d'incubation : courte, de l'ordre de 3 à 5j, et correspondant au temps nécessaire à la virémie ;
- la phase d'état, durant laquelle les symptômes sont exprimés, dure environ une semaine
- la mort ou de la guérison de l'animal.



Il existe différentes formes cliniques :

- Forme suraigüe, fréquente chez le très jeune chiot, mort en 2 jours ou retrouvé mort sans symptômes préalables.
- Forme aigüe avec déshydratation et complications bactériennes possibles, mort en 5 à 6 jours si aucun traitement n'est administré. C'est par exemple la forme qui a touché la première portée de 7 Bassets Hounds sur laquelle a été isolé le CPV-2c en Espagne en 2006. **DECARO et al. (2006 d)**
- Forme inapparente avec aucun symptôme visible mais contamination des congénères possible, fréquente chez le chien adulte.

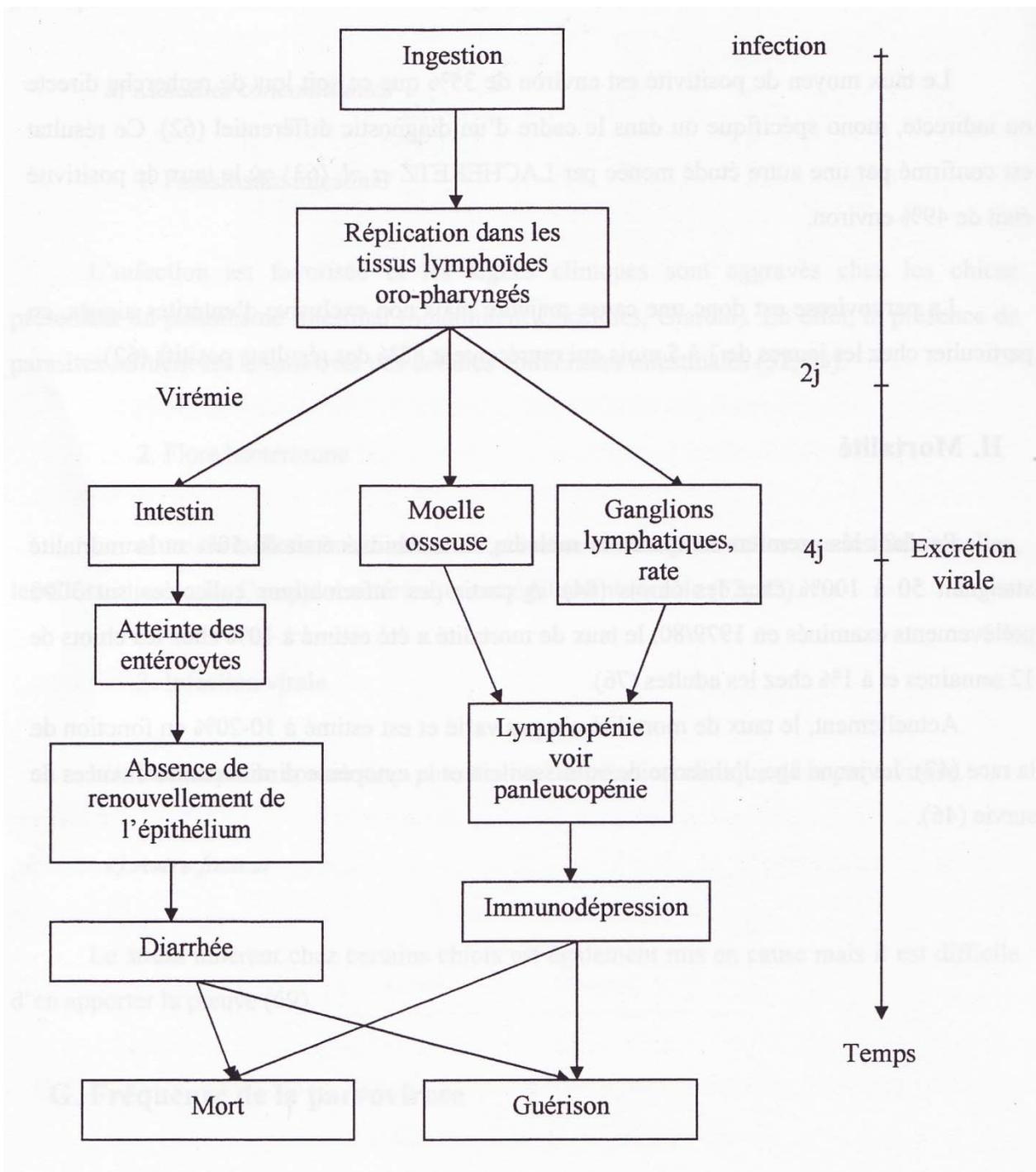
Les chiots âgés de 6 à 12 semaines sont les plus sensibles au parvovirus car c'est la période critique pendant laquelle l'immunité maternelle ne les protège plus assez et inhibe la réponse immunitaire de la vaccination.

### *b. La virémie*

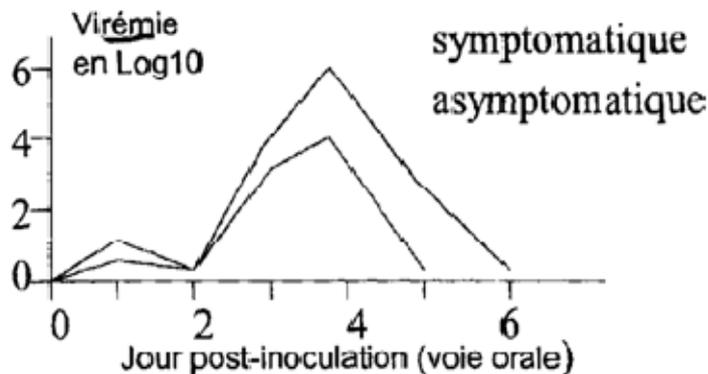
La virémie est l'étape primordiale de la pathogénie de l'infection par le parvovirus. En effet, c'est tout d'abord une maladie systémique car le virus atteint la muqueuse intestinale plutôt par le biais de la circulation sanguine que par la lumière intestinale. Le virus est très résistant dans l'organisme. Le titre viral sérique peut atteindre  $10^4$  à  $10^7$  DCIT/mL chez les animaux symptomatiques. (FIGURE 22).

Après son entrée par voie orale, le virus s'installe dans les amygdales ou dans l'épithélium pharyngé. (FIGURE 21). Il déclenche alors une virémie 2 jours après l'ingestion, qui atteint d'abord l'épithélium lingual, la cavité orale, l'œsophage, l'intestin grêle dès le 4<sup>e</sup> jour mais aussi les nœuds lymphatiques, la rate, le thymus, la moëlle osseuse et les plaques de Peyer. La virémie plasmatique dure 3 jours et semble être due à une lymphocytolyse induite par le virus. A partir des plaques de Peyer, le virus diffuse par voisinage de cellule en cellule pour aller se multiplier dans les cellules intestinales : les entérocytes des cryptes de Lieberkühn qui sont en perpétuelle mitose. En effet, le virus ne se réplique que durant la phase S du cycle des cellules à fort taux de réplication. Ces cellules sont colonisées par voie sanguine mais aussi dans une moindre mesure par voie oro-nasale en passant par la lumière digestive. En effet, on a vu que le virus résiste au pH acide de l'estomac. Les entérocytes sont ensuite lysés par le cycle viral et les symptômes apparaissent. L'intensité de la virémie conditionne donc les lésions et la sévérité des signes cliniques. **STEINEL A *et al.* (2001).** Le début de l'excrétion fécale suit de près la virémie ce qui prouve une réplication secondaire du virus dans les intestins.

Figure 21 : Schémas général de la virémie. D'après VOLLMER H, (2005)



**Figure 22** : Virémie en fonction du temps. D'après **Polycopié de Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (2006/2007)**



La quantité de virus présente dans le sang est maximale 4 jours post inoculation lors de tests réalisés pour suivre l'évolution virale du parvovirus.

## 2. Les symptômes

Le parvovirus entraîne faiblesse, perte d'appétit, vomissements, diarrhée mucoïde à hémorragique et leucopénie mais trois formes peuvent être retrouvées : entérique, myocardique et inapparente.

### a. *Forme entérique*

#### i. *Évolution clinique*

Les chiots de 2 à 6 mois sont les plus touchés. Les symptômes les plus courants sont la léthargie, la prostration, l'anorexie, une hyperthermie (39.8 à 40.5°C) dans 50 % des cas le premier jour.

Le deuxième jour, des vomissements apparaissent, une déshydratation et un amaigrissement sont notés. Parfois, les efforts de vomissement sont visibles mais aucun contenu ne sort quand l'anorexie est totale. La douleur abdominale est marquée par un abdomen tendu et un dos voussé. Les chiens cherchent parfois à boire mais vomissent ensuite.

12 à 24 h plus tard, une diarrhée hémorragique, nauséabonde et noire, apparaît dans 50% des cas. Il y a une entérite car le renouvellement des villosités est empêché par l'infection virale des entérocytes des cryptes. La déshydratation s'accroît et la maigreur tend vers la cachexie. Une anémie et une leucopénie sont présentes dans 60 à 70% des cas. La déshydratation entraîne une

modification du ionogramme avec une concentration plus faible en potassium, chlorure et bicarbonates. Le sodium peut diminuer ou augmenter. Le taux de protéines totales est diminué en raison des pertes digestives consécutives à la diarrhée. Les malades restent dans leur coin, ils évitent tout contact avec les autres animaux. **MORAILLON A, (1982)**

La température corporelle descend alors progressivement jusqu'à 35°C, un choc hypovolémique survient puis la mort s'ensuit dans la plupart des cas. Elle est due à la perte excessive d'eau et d'électrolytes, à l'acidose et à une endotoxémie qui s'installe fréquemment. L'acidose est causée par la perte des bicarbonates et entraîne l'apathie et l'anorexie (TABLEAU 6). **VOLLMER H (2005)**

**Tableau 6** : Répartition des symptômes observés par fréquence. D'après **MORAILLON A (1982)**

| Symptômes          | Pourcentage des chiens atteints |
|--------------------|---------------------------------|
| Diarrhée           | 100%                            |
| - Hémorragique     | 45%                             |
| - Non hémorragique | 55%                             |
| Vomissements       | 85%                             |
| Abattement         | 48%                             |
| Anorexie           | 48%                             |
| Hyperthermie       | 45%                             |
| Déshydratation     | 43%                             |
| Leucopénie         | 28%                             |
| Abdomen distendu   | 15%                             |

La présence d'une hyperthermie n'est pas systématique (45% des cas). (TABLEAU 7). Souvent les chiens présentent une élévation modérée de la température rectale avec un pic 5 jours post-inoculation, lors de l'apparition des anticorps et de la fin de la virémie.

Une étude menée par **MOON H et al. (2008)** compare l'évolution clinique chez deux groupes de chiots, l'un inoculé par CPV-2a I ou 2a V et l'autre inoculé par CPV-2b. Les chiots infectés par CPV-2a montrent des signes cliniques plus précoces et plus graves que ceux inoculés par CPV-2b ainsi qu'une létalité supérieure. De plus, la perte de poids est plus rapide avec CPV-2a qui est donc plus pathogène et plus mortelle. (TABLEAU 7)

**Tableau 7** ; Comparaison des données cliniques chez des chiens infectés par des variants de CPV-2.

D'après **MOON H *et al.* (2008)**

|  | CPV-2a-I   | CPV-2a-V   | CPV-2b     |
|--|------------|------------|------------|
| Morbidity/mortality (%)                                | 100 (60)   | 100 (80)   | 100 (20)   |
| Recovery rate after CPV-2 infection (%)                | 40         | 20         | 80         |
| Mean time to show watery diarrhea (days)               | 3.4 ± 1.34 | 4.2 ± 2.68 | 5.4 ± 2.41 |
| Mean time to death after showing clinical signs (days) | 5.3 ± 1.15 | 4.6 ± 1.52 | 3          |
| Mean time to show leukopenia (days)                    | 5.2 ± 1.09 | 8.0 ± 4.35 | 9.8 ± 4.35 |
| Mean duration of leukopenia (days)                     | 3.2 ± 1.09 | 3.0 ± 1.00 | 2.0 ± 0.82 |
| Percentile of dogs having leukopenia (%)               | 100        | 100        | 80         |
| Percentile of dogs having lymphopenia (%)              | 100        | 60         | 20         |

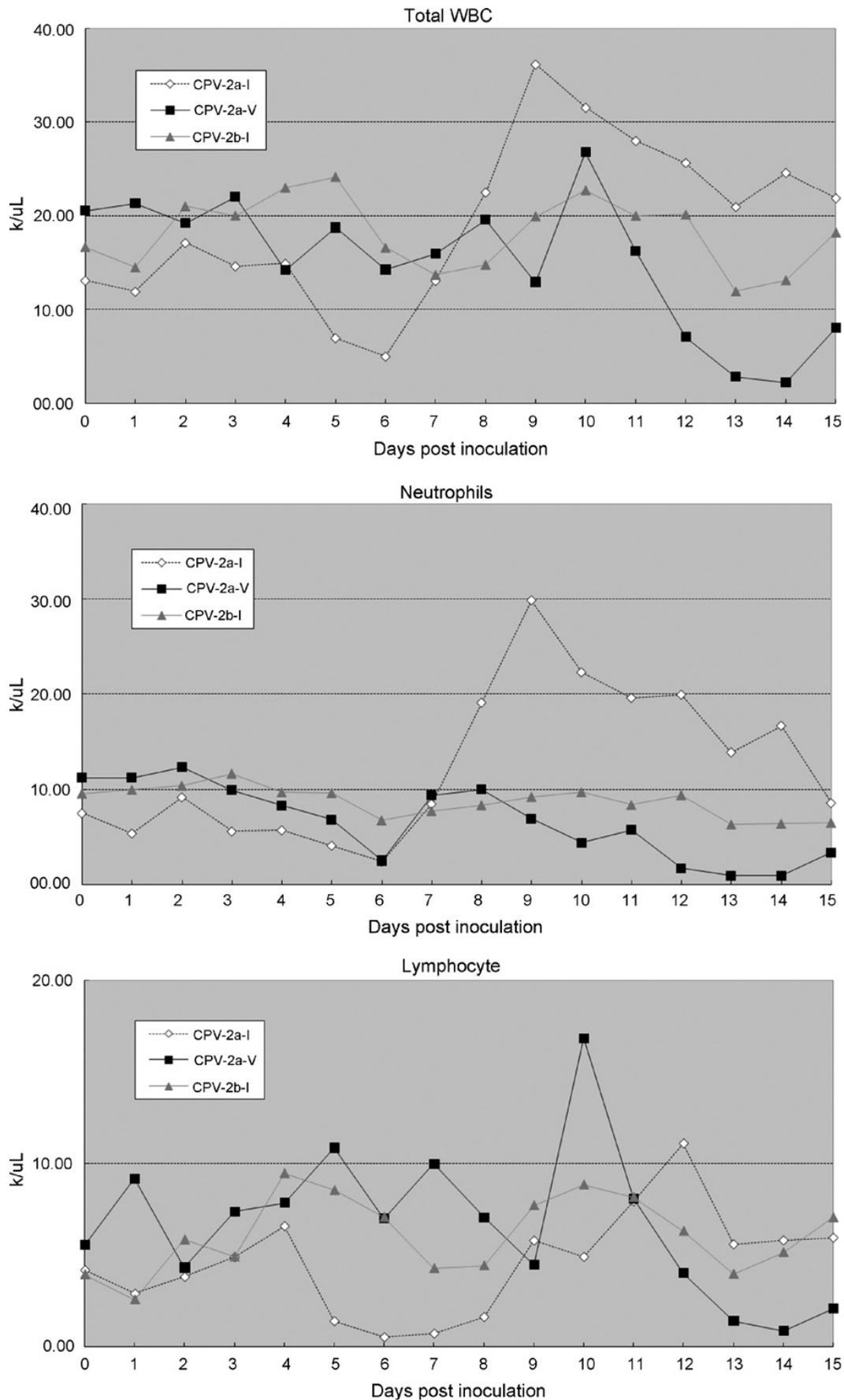
## ii. Modifications hématologiques

Le virus se multiplie uniquement dans les cellules en division des cryptes intestinales et dans les cellules lymphoïdes, entraînant une lymphopénie associée à une leucopénie et une neutropénie lors d'atteintes sévères. La lymphopénie est l'atteinte hématologique la plus constante chez le chiot et l'adulte infectés. Elle reflète la nécrose des tissus lymphoïdes et la destruction des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes (thymus, rate, nœuds lymphatiques, tissus lymphoïdes associés aux intestins). L'atteinte de la moëlle osseuse n'aurait qu'un rôle secondaire.

**MOON H *et al.* (2008)** montre l'évolution de la lymphopénie (<3000/mL), de la leucopénie (<6000/mL) et de la neutrophilie (<1000/mL) chez des chiots inoculés par différentes souches (FIGURE 23). On constate que des valeurs très basses sont atteintes. La diminution du taux de lymphocytes est observée dès le 4<sup>e</sup> jour post-infection. Une leucocytose neutrophilique et une lymphocytose sont présentes chez les chiots qui survivent à cette maladie alors qu'une leucopénie, une neutrophilie et une lymphopénie sont présentes chez tous les chiots décédés. Ces analyses expliquent l'issue rapidement fatale de cette maladie. La sévérité de la leucopénie coïncide avec la mortalité. Un pic en anticorps est constaté juste avant la mort des chiots décédés et entre 11 et 13 jours post-infection chez les survivants. Le titre en anticorps augmente en parallèle de la diminution des symptômes. Chez les chiots infectés par CPV-2b, seulement 80% présentent une leucopénie.

L'hématocrite est généralement augmenté suite à la déshydratation.

**Figure 23** : Evolution du taux de globules blancs, lymphocytes et neutrophiles chez des chiens inoculés avec CPV-2a ou 2b. D'après **MOON H et al. (2008)**



- Une hypercoagulabilité favorisant la formation de thrombi serait aussi engendrée par le parvovirus. Elle serait due à la présence d'endotoxines dans le sang de 80% des chiens atteints de parvovirose. Une diminution du taux d'antithrombine III et une augmentation du fibrinogène entraînent alors thrombose et phlébites en particulier sur le site du cathéter veineux périphérique. **OTTO et al. (2000)**. On retrouve ce symptôme en particulier dans les infections à CPV-2b car il se multiplie mieux dans l'intestin et entraîne des fuites protéiques très importantes. Ainsi apparaissent des thrombo-embolies dues à une hypercoagulabilité par manque de protéines formant les anticoagulase. Une autre complication peut être une myélofibrose (fibrose des cellules de la moëlle).

### iii. Symptômes particuliers chez le chat

Les chats présentent de multiples symptômes très variables lors de l'infection par CPV-2a : perte de poids, retard de croissance mais le symptôme constant est la leucopénie. Cependant la plupart des chats infectés par CPV-2a sont asymptomatiques. Les signes entériques rares semblent être causés par des surinfections bactériennes chez le chat. **IKEDA Y et al. (2002)** montrent, par l'inoculation de FPV, CPV-2a et 2b à des chats sains, que seul le groupe infecté par FPV présente de forts symptômes. Aucun symptôme présent lors d'infection avec FPV, tel que l'ataxie, n'est retrouvée lors d'infection avec CPV-2a ou 2b. Ces dernières souches semblent faiblement pathogènes chez le chat. Les groupes inoculés avec CPV-2a ou 2b présentent seulement une faible lymphopénie. De plus, ces souches ont été retrouvées chez des chats en parfaite santé. La virulence dépend donc en grande partie de l'état de santé du chat infecté : un chat en parfaite santé exprimera peu la maladie. A l'inverse, un chat affaibli développera une maladie proche de celle de la parvovirose canine comme le montrent **MOCHIZUKI et al. en 1996**. Un chat affaibli présentant une diarrhée hémorragique, des vomissements, de l'anorexie, une leucopénie (3000 cellules/mL) puis la mort 13 jours après la première consultation, malgré un traitement médical intensif, s'est révélé être infecté par CPV-2a. Cependant, ces cas sont rares chez les chats mais plus fréquent chez les félinés sauvages tels que des tigres ou des guépards souffrant de diarrhée chronique et d'anorexie chez qui des souches CPV-2a ou 2b ont été isolées.

### *b. Forme cardiaque*

Cette forme clinique était fréquente lors de l'émergence du parvovirus mais elle est aujourd'hui exceptionnelle. Chez les nouveaux nés, le virus se multiplie dans de nombreuses cellules de l'organisme car les réplifications sont nombreuses. Il infecte alors les cardiomyocytes des très jeunes chiots de moins de trois semaines entraînant une myocardite primitive non suppurative. Les signes de dysfonctionnement cardiaque peuvent apparaître suite à la forme entérique. Les chiens présentent de la dyspnée, des plaintes et sont prostrés. Lorsque le temps le permet, l'auscultation cardiaque peut révéler un souffle. Une hypo contractilité s'installe, induite par la nécrose des cardiomyocytes. L'apparition soudaine d'une insuffisance cardiaque congestive doit être un signe d'appel car c'est rare chez un chien de moins d'un an. A l'examen nécroscopique, on observe un élargissement du ventricule et de l'oreillette gauche. De l'ascite, un épanchement pleural ou une hépatomégalie peuvent être des complications relevées. Un œdème pulmonaire peut être constaté. **VOLLMER H (2005)**. Aucune lésion cérébelleuse n'est constatée avec le parvovirus contrairement aux symptômes décrits chez les jeunes chatons infectés par FPV.

Chez les animaux plus âgés, l'infection virale se limite aux cellules lymphoïdes et intestinales. La myocardite est rencontrée actuellement uniquement chez des chiots très jeunes (moins de 2 mois), totalement dépourvus de protection immunitaire, lorsque leurs cardiomyocytes sont encore en division. Les mères étant aujourd'hui souvent vaccinées, les anticorps maternels protègent encore le chiot contre le parvovirus avant l'âge de deux mois. Ceux n'ayant pas ingéré le colostrum ou nés de mère non vaccinée sont susceptibles de présenter cette forme clinique, si une infection dans les 8 semaines suivant la naissance. Dans la majorité des cas, plusieurs chiots de la portée sont touchés. **SHAKELTON L et al. (2004)**.

Le diagnostic expérimental nécessite le recours à l'histopathologie (infiltrat de cellules inflammatoires et immunitaires).

Cette forme cardiaque entraîne un fort taux de mortalité chez les chiots. Le pronostic est alors très sombre.

### 3. Comparaison de la pathogénicité des souches

#### a. *Chez le chien*

CPV 2a et 2b sont les plus virulents. La période d'incubation est plus courte (4 à 5 jours), l'excrétion est plus importante en quantité et ils sont à l'origine de formes aiguës ou suraiguës, provoquant des symptômes plus sévères que CPV-2.

Lors de la découverte de CPV-2c, on l'a cru moins sévère et responsable d'un taux de mortalité inférieur.

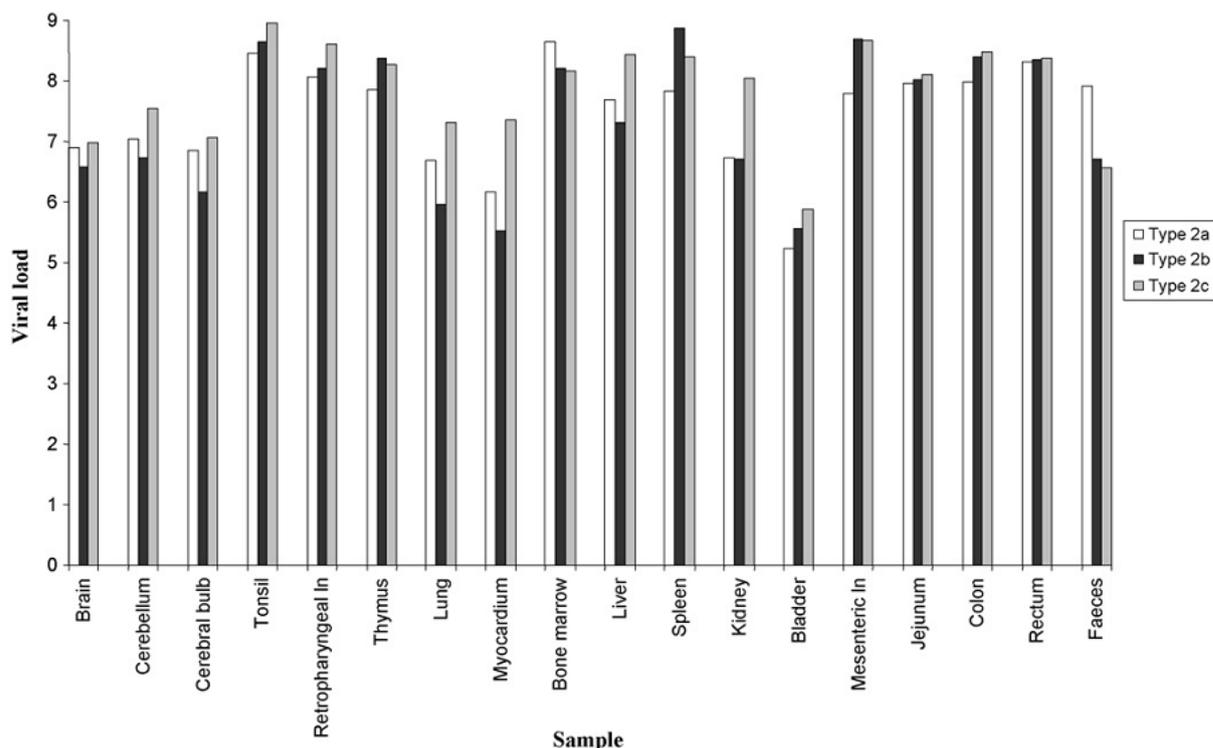
Les symptômes les plus fréquents sont quelque peu différents de ceux observés pour CPV-2a/2b : dès le 8<sup>e</sup> j, une diarrhée mucocœde s'installe pendant 3,5 jours, de la fièvre entre 39.8 et 39.5 °C est présente, une perte d'appétit apparaît pendant 3j , un abattement est observé pendant 1,5j et des troubles sanguins apparaissent : leucopénie dès le 9<sup>e</sup> j pendant 2,5 j avec 6,025 GB/mm<sup>3</sup>, lymphopénie pendant 2,5j à partir du jour 11 avec 1,140 lymphocytes/mm<sup>3</sup> **DECARO et al. (2005)**. Certaines portées n'ont présenté qu'un ou deux chiots malades alors que CPV-2c a été mis en évidence chez tous les chiots. Il semblerait donc que CPV-2c puisse même être asymptomatique chez certains chiots. Cependant, ces affirmations sont controversées car un plan d'alerte a été déclenché aux Etats-Unis aux vues de la gravité des symptômes et de la forte mortalité. De même, en Amérique du sud, de sévères diarrhées hémorragiques sont constatées et un pronostic très sombre est souvent annoncé chez des animaux de 1 à 11 mois. **PEREZ R et al. (2007)**

Des chiens jusqu'à 36 semaines d'âge ont présenté des symptômes violents suite à une infection au CPV-2c au Portugal. Dans l'étude de **VIEIRA J et al.** menée en **2008**, l'auteur précise que les témoignages sont contradictoires par rapport à la pathogénicité de CPV-2c chez le chien. Il semble donc qu'il existe des sous-types de CPV-2c plus virulents que d'autres mais aujourd'hui, des études on montré qu'il infecte même des sujets adultes vaccinés depuis plusieurs années qu'il est majoritairement responsable de symptômes sévères et engendre une mortalité élevée. **DECARO et al. (2009 a)**.

**DECARO et al. (2007 a)** ont étudié la répartition de la charge virale des souches de CPV dans les différents tissus de chiens morts. Il est alors démontré que de l'ADN viral est présent dans les tissus nerveux comme le cerveau, le cervelet et le bulbe. Les plus hauts titres de virus se trouvent dans les tissus lymphoïdes. Le titre maximal est retrouvé pour le CPV-2c ( $8.98 \cdot 10^8$  copies d'ADN/10 microlitres). Les plus faibles titres retrouvés sont dans la vessie ( $10^5$  copies d'ADN/microlitres). (FIGURE 24). Les titres retrouvés dans les fèces sont en quantité inférieure aux titres des organes

( $8.10 \times 10^7$  copies d'ADN/microlitres). Ainsi il semble que la charge virale de CPV-2c soit la plus importante parmi les tissus et en particulier dans les tissus lymphoïdes et nerveux en comparaison des souches 2a et 2b.

**Figure 24** : Charge d'ADN viral retrouvé par PCR en temps réel dans différents tissus chez des chiens morts infectés naturellement par CPV-2a, 2b ou 2c. D'après **DECARO N *et al.* (2007 a)**.



*b. Chez le chat*

Les chats infectés par CPV-2a et 2b sont souvent asymptomatiques (TABLEAU 8) ou présentent une faible lymphopénie si leur état de santé général, lors de l'infection, est bon. A l'inverse, les chats infectés par CPV-2c présenteraient tous des symptômes plutôt forts et très proches de ceux induits par FPV. **NAKAMURA K *et al.* (2006)**. CPV-2c serait donc plus pathogène chez le chat que CPV-2a/2b et engendrerait une diarrhée et une anorexie.

**Tableau 8** : Présence de CPV chez les chats non vaccinés. D'après **IKEDA Y et al. (2000)**.

Etude chez des chats non vaccinés asymptomatiques

| Isolates  | 80  | 87  | 99  | 103 | 232 | 297 | 390 | 306 | 323 | 428 | 555 | 564 | 568 | FPV-type  |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|
| Taiwan 9  | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly | CPV-2a    |
| LCPV-T1   | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly | CPV-2a    |
| V120      | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly | CPV-2a    |
| V123      | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly | CPV-2b    |
| V129      | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly | CPV-2a    |
| V142      | Lys | Met | Lys | Val | Val | Ser | Ala | Asp | Asn | Asn | Val | Asn | Ala | FPLV      |
| V154      | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly | CPV-2a    |
| V208      | Lys | Met | Lys | Val | Val | Ser | Ala | Asp | Asp | Asn | Val | Asn | Ala | FPLV      |
| V209      | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly | CPV-2b    |
| V211      | Lys | Met | Lys | Val | Val | Ser | Ala | Asp | Asp | Asn | Val | Asn | Ala | FPLV      |
| V217      | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly | CPV-2b    |
| V220      | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly | CPV-2a    |
| LCPV-V139 | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Asp | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly | CPV-2c(a) |
| LCPV-V140 | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Asp | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly | CPV-2c(a) |
| LCPV-V203 | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Asp | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly | CPV-2c(b) |
| LCPV-V204 | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly | CPV-2b    |
| LCPV-V205 | Arg | Leu | Asn | Ala | Ile | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly | CPV-2b    |

- CPV-2a, 2b et 2c ont été découverts à plusieurs reprises associés au coronavirus lors d'infections aiguës. Il semblerait que le coronavirus type I et II exacerbe la virulence du parvovirus donnant un pronostic encore plus sombre. **DECARO N et al. (2006 d)**. Une étude réalisée par **DECARO N et al. (2009 b)**, visant à évaluer la répartition européenne du parvovirus et du coronavirus, met en évidence une co-infection parvovirus/coronavirus sur 28 échantillons de fèces parmi 156 (soit 18%). Cependant, le coronavirus doit être mis en évidence dans l'intestin pour pouvoir affirmer qu'il est lui aussi responsable des symptômes constatés. En effet, il est retrouvé seul dans des fèces de chiens asymptomatiques. Des vaccins oro-nasaux vivants atténués existent contre le coronavirus.

## II. LES LESIONS

### 1. Macroscopiques

Les lésions sont visibles à partir du 4<sup>e</sup> jour post-inoculation.

A l'examen nécroscopique :

L'estomac est souvent vide ou contient un liquide blanc-jaunâtre. La muqueuse est grise et rugueuse.

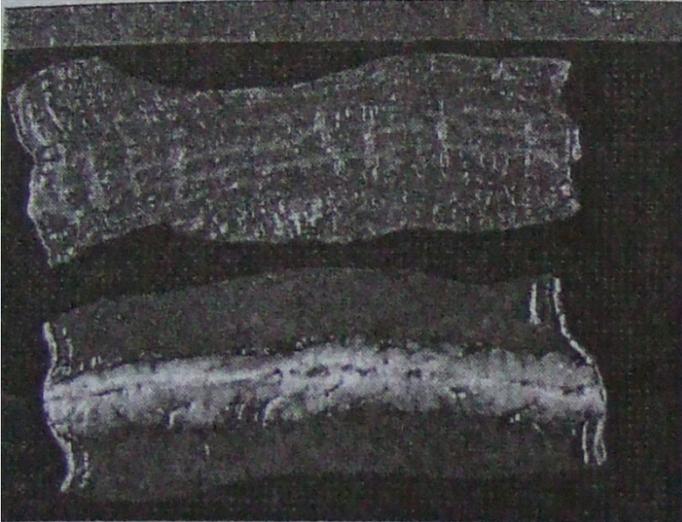
Les lésions intestinales apparaissent au 6<sup>e</sup> jour post-inoculation per os. Les cellules épithéliales de l'intestin sont la principale cible de CPV2 ainsi que les cellules lymphoïdes. Les lésions les plus marquées sont dans la portion proximale de l'intestin grêle : congestion, hémorragie, abrasion des villosités (FIGURE 25). Le jéjunum est congestionné, hémorragique, le contenu est du sang en nature. La portion moyenne du jéjunum est la moins affectée car elle contient peu de cellules lymphoïdes. Des lésions d'invagination sont dues à l'hyper péristaltisme. Les entérocytes des cryptes sont nécrosés. Un mucus hémorragique est retrouvé dans le colon. **VOLLMER H (2005)**

Les ganglions mésentériques sont hypertrophiés, oedématiés et hémorragiques à la coupe.

Les organes abdominaux peuvent être anémiés. La rate est souvent hypertrophiée et présente un aspect hémorragique. Le thymus diminue à partir du 6<sup>e</sup> jour post-inoculation.

Le cœur peut présenter une myocardite mais c'est aujourd'hui très rare.

**Figure 25** : Aspect hémorragique de la muqueuse intestinale. D'après **Service d'autopsie Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (2006/2007)**



Une étude menée par **MOON H *et al.* (2008)** en Corée permet de comparer les lésions histopathologiques causées par différentes souches de parvovirus. (FIGURE 26). Une déplétion des cellules lymphoïdes du thymus, une adénomégalie des nœuds lymphatiques rétro pharyngés et mésentériques, une érosion des plaques de Peyer en région de l'iléus, une abrasion des cryptes et une fusion des villosités de l'intestin grêle sont les lésions retrouvées en plus grand nombre chez les chiots infectés par les deux souches CPV-2a et 2b. Aucune lésion cardiaque n'est signalée.

**Figure 26** : Comparaison de la sévérité des lésions histopathologiques chez des chiens inoculés avec CPV-2a ou 2b. D'après **MOON H et al. (2008)**

|             | Cerebrum | Cerebellum | Tonsil | Retropharyngeal lymph node | Thymus | Mesenteric lymph node | Jejunum | Ileum | Colon | Rectum | Myocardium | Liver | Lung | Kidney | Spleen | Bone marrow | Bladder |
|-------------|----------|------------|--------|----------------------------|--------|-----------------------|---------|-------|-------|--------|------------|-------|------|--------|--------|-------------|---------|
| <b>2a-I</b> |          |            |        |                            |        |                       |         |       |       |        |            |       |      |        |        |             |         |
| 1           | -        | -          | +      | -                          | -      | ++                    | +++     | ++    | +     | +      | -          | -     | -    | -      | -      | -           | -       |
| 2           | -        | -          | -      | -                          | -      | +                     | +       | +     | +     | -      | -          | -     | -    | -      | -      | -           | -       |
| 3           | -        | -          | +      | +                          | -      | +                     | +       | +     | +     | -      | -          | -     | -    | -      | -      | -           | -       |
| 4           | -        | -          | ++     | +                          | -      | ++                    | +++     | ++    | ++    | +      | -          | -     | -    | -      | +      | +           | -       |
| 5           | -        | -          | +      | -                          | -      | +                     | ++      | +++   | +     | +      | -          | -     | -    | -      | +      | +           | -       |
| <b>2a-V</b> |          |            |        |                            |        |                       |         |       |       |        |            |       |      |        |        |             |         |
| 1           | -        | -          | +      | -                          | -      | +                     | ++      | ++    | +     | -      | -          | -     | -    | -      | -      | -           | -       |
| 2           | -        | -          | +      | +                          | -      | -                     | ++      | +++   | +     | -      | -          | -     | -    | -      | -      | -           | -       |
| 3           | -        | -          | +      | +                          | -      | +                     | +       | ++    | ++    | +      | -          | -     | -    | -      | +      | +           | -       |
| 4           | -        | -          | ++     | ++                         | -      | ++                    | +++     | +++   | ++    | -      | -          | -     | -    | -      | +      | +           | -       |
| 5           | -        | -          | ++     | ++                         | -      | ++                    | ++      | +++   | ++    | +      | -          | -     | -    | -      | +      | -           | -       |
| <b>2b-I</b> |          |            |        |                            |        |                       |         |       |       |        |            |       |      |        |        |             |         |
| 1           | -        | -          | +      | -                          | -      | ++                    | +       | ++    | ++    | +      | -          | -     | -    | -      | +      | -           | -       |
| 2           | -        | -          | +      | +                          | -      | +                     | ++      | +++   | ++    | +      | -          | -     | -    | -      | +      | -           | -       |
| 3           | -        | -          | +      | +                          | -      | +                     | +       | ++    | +     | -      | -          | -     | -    | -      | +      | -           | -       |
| 4           | -        | -          | -      | -                          | -      | -                     | +       | +     | +     | -      | -          | -     | -    | -      | -      | -           | -       |
| 5           | -        | -          | -      | -                          | -      | +                     | +       | +     | +     | -      | -          | -     | -    | -      | -      | +           | -       |

## 2. Microscopiques

Les lésions sont plus marquées chez les animaux symptomatiques. La lésion dominante est la nécrose extensive des cellules des cryptes intestinales. Les villosités disparaissent et l'absorption ne se fait plus, ce qui entraîne une diarrhée profuse. On constate une déplétion marquée des lymphocytes des plaques de Peyer qui peuvent être hémorragiques et nécrotiques. Dans la paroi intestinale, des pétéchies peuvent être remarquées dans la lamina propria accompagnées de la perte

de l'épithélium muqueux (FIGURE 27). Dans le colon, l'épithélium muqueux est souvent perdu et des érosions sont notées dans la lamina propia avec des parties nécrotiques possibles.

Les différents organes abdominaux peuvent présenter des modifications microscopiques. Dans le foie, la capsule de Glisson peut présenter des infiltrations lymphocytaires. Une discrète néphrite interstitielle peut toucher les reins. Une déplétion du centre germinal des nœuds lymphatiques est suivie d'une hyperplasie régénérative. On observe un amincissement du cortex thymique.

**MOCHIZUKI *et al.* (1996)**

Les organes comme l'intestin peuvent être marqués par immunofluorescence pour rechercher la présence du virus. Des inclusions basophiles sont observées dans les cellules épithéliales de l'intestin. **SAVIC JVEDENIS S *et al.* (2006).**

**Figure 27 : Abrasion des villosités intestinales. D'après Service d'autopsie Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (2006/2007)**



### III. METHODES DIAGNOSTIC

#### 1. Diagnostic Clinique

Le diagnostic clinique est difficile pour ce virus car les signes majeurs sont ceux communs à toute pathologie digestive. Cependant, un tableau clinique de gastro-entérite chez un chiot de 6 semaines à 6 mois évoluant en quelques jours vers la guérison ou la mort doit obligatoirement faire suspecter une parvovirose. La diarrhée est une constante dans la parvovirose canine (100% des cas) (TABLEAU 6) mais le raccourci diarrhée hémorragique/parvovirus n'est pas forcément vrai. En effet, la diarrhée hémorragique présente dans 45% des cas, n'est pas un signe spécifique. De même, l'absence de sang dans les selles ne permet pas d'exclure le parvovirus.

De la même manière, les selles présentent une odeur typique du parvovirus qui correspond à l'élimination des débris nécrotiques d'abrasion des villosités. Cependant, les nouvelles souches CPV-2c n'entraînent pas forcément d'odeur typique et ce signe est peu spécifique car une odeur particulière est aussi présente en cas de coronavirose ou de cryptosporidiose. **MORAILLON A, (1982)**

Dans les collectivités, le diagnostic est plus aisé compte tenu du caractère contagieux de cette maladie.

Le diagnostic clinique n'est qu'un diagnostic de suspicion, surtout lors de cas isolés. Suite à une forte suspicion clinique, les vétérinaires envoient dans 66% des cas un prélèvement aux laboratoires pour rechercher le parvovirus. Le taux de positivité est alors environ de 35% à 50% tout âge confondu, mais il s'élève à 88% chez les moins de 5 mois. La parvovirose est donc une cause majeure mais non exclusive d'entérite aiguë, en particulier chez les jeunes de 1 à 5 mois.

#### 2. Diagnostic Différentiel

Les autres causes de diarrhée aiguë chez un chiot doivent être prises en compte :

- Origine alimentaire : changement alimentaire sans transition, ingestion de corps étrangers, intoxication.

- Origine mécanique : obstruction, occlusion. Une altération marquée de l'état général prédomine alors.
- Origine infectieuse : Parasitaire (coccidies, helminthes). Une coproscopie positive n'exclue pas une parvovirose concomitante.

Virale (coronavirus, rotavirus). L'évolution clinique permet de faire la différence : plus lentes (6 à 14j), peu mortelles. La maladie de Carré peut aussi être envisagée mais le tableau clinique est plus polymorphe que pour la parvovirose.

Bactérienne (salmonelles, Campylobacter, leptospires)

### 3. Examens complémentaires

Il existe aujourd'hui des tests rapides et efficaces, utilisable en clinique, et des tests de laboratoire, plus fiables et incontournables, pour diagnostiquer le parvovirus canin. Le diagnostic final est souvent tardif ce qui assombri le pronostic.

#### *a. Prélèvements*

Un écouvillon rectal peut être effectué.

Des fèces en nature peuvent être récoltées. Il semble cependant que la charge virale soit maximale à 5 jours post-infection puisqu'elle diminue significativement à 10 jours post-infection.

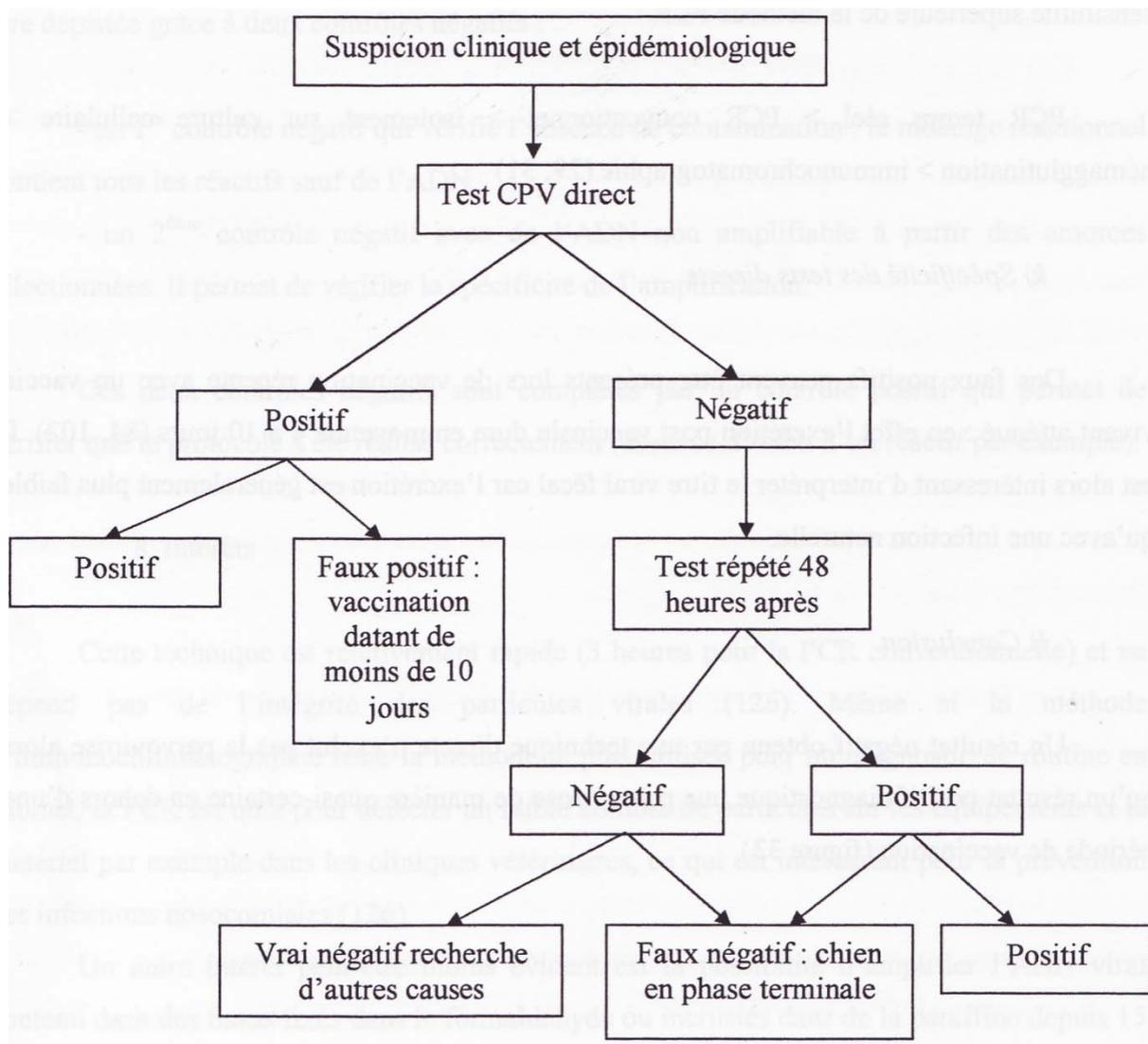
Une prise de sang permet des examens sérologiques. Lorsque l'infection est avancée, la forte charge d'anticorps entraîne une séquestration des virions et peut donc donner des résultats faussement négatifs lors de tests comme l'hémagglutination ou l'isolement du virus. **DECARO et al (2007 c).**

#### *b. Diagnostic direct*

Un résultat négatif obtenu par une méthode directe n'exclut pas la parvovirose, alors qu'un résultat positif diagnostique une parvovirose de manière presque certaine.

En fonction du résultat du test, un raisonnement doit être mené pour apprécier la confiance à accorder au test et les autres éventuelles démarches à suivre (FIGURE 28)

**Figure 28** : Arbre diagnostique de la Parvovirose. D'après **STEINEL et al. (2001)**

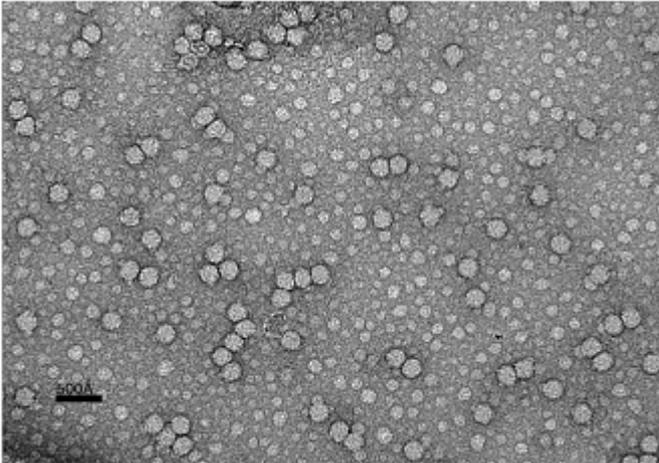


i. Observation du virus par microscopie électronique

La microscopie électronique permet la première mise en évidence du virus en 1978 par **EUGSTER et al.** Le virus est souvent observé dans les selles sous forme d'agrégats. Les inclusions forment une masse intranucléaire éosinophile puis basophile dans un second temps. La chromatine est repoussée vers la membrane nucléaire soulignée alors par un halo clair. Le plus grand nombre d'inclusions est observé 3 à 8 jours post-infection. (FIGURE 29)

Cette technique est globalement fiable mais elle dépend de l'intégrité des particules virales. De plus, des faux négatifs peuvent être observés et elle nécessite un équipement coûteux. Cet examen permet l'identification éventuelle d'autres virus concomitants.

**Figure 29** : Parvovirus canin en microscopie électronique avec un excès de TfR pour lier et agréger les virus. D'après **HAFENSTEIN F et al. (2007)**



- ii. RFLP, ou PCR basée sur le polymorphisme de la taille des fragments de restriction

- Principe :

La digestion de l'ADN viral, souvent amplifié précédemment par PCR, par un panel d'enzymes de restriction permet d'obtenir des fragments d'ADN que l'on fait migrer sur gel d'Agarose et que l'on identifie par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire. (FIGURE 30 A). Les fragments d'ADN sont visualisés grâce au bromure d'éthidium (BrEt) qui émet une fluorescence lorsqu'il est soumis aux rayons UV.

- Intérêt :

Une analyse moléculaire par RFLP (restriction fragment length polymorphism) peut être réalisée pour différencier CPV-2c des autres souches de parvovirus (FIGURE 30 B) : les produits de la PCR (post amplification) sont mis en présence d'une enzyme de restriction, par exemple une endonucléase ALU I ou encore MboII. En fonction des sites de clivage, les fragments, alors séparés par électrophorèse, signalent d'éventuelles mutations en fonction de la stabilité de leur taille. De plus, les enzymes peuvent être spécifiques d'un sous-type : le choix des enzymes de restriction permet de différencier les souches CPV-2 des souches 2a/2b et des souches 2c. Par exemple, la digestion par l'enzyme MboII d'un fragment amplifié par PCR (amorce sens 555for et anti-sens

555rev), incluant le site de restriction de cette enzyme (GAGAA localisé au nucléotide 4062-4066) permet l'identification de CPV-2c, ou Glu-426. **DECARO *et al.* (2005)**.

La RFLP permet encore de vérifier la spécificité de l'amplification d'un fragment par PCR.

- Limites :

La RFLP a des limites, elle ne permet par exemple pas de distinguer CPV-2a de CPV-2b, ni de mettre en évidence de nouvelles souches de parvovirus.

Pour distinguer toutes les souches de parvovirus et identifier d'éventuels mutants, une PCR en temps réels a été développée, basée sur des MGB (minor groove protein).

**Figure 30** : **A** : Electrophorèse sur gel suite à une RFLP pour distinguer les sous-types 2a, 2b, et les nouveaux 2a et 2b. D'après **OHSIMA T *et al* (2008)**. **B** : Mise en évidence par RFLP de la différence d'acides aminés entre CPV-2c (ou Glu-426) et les autres sous-types. D'après **MARTELLA V *et al* (2005)**.

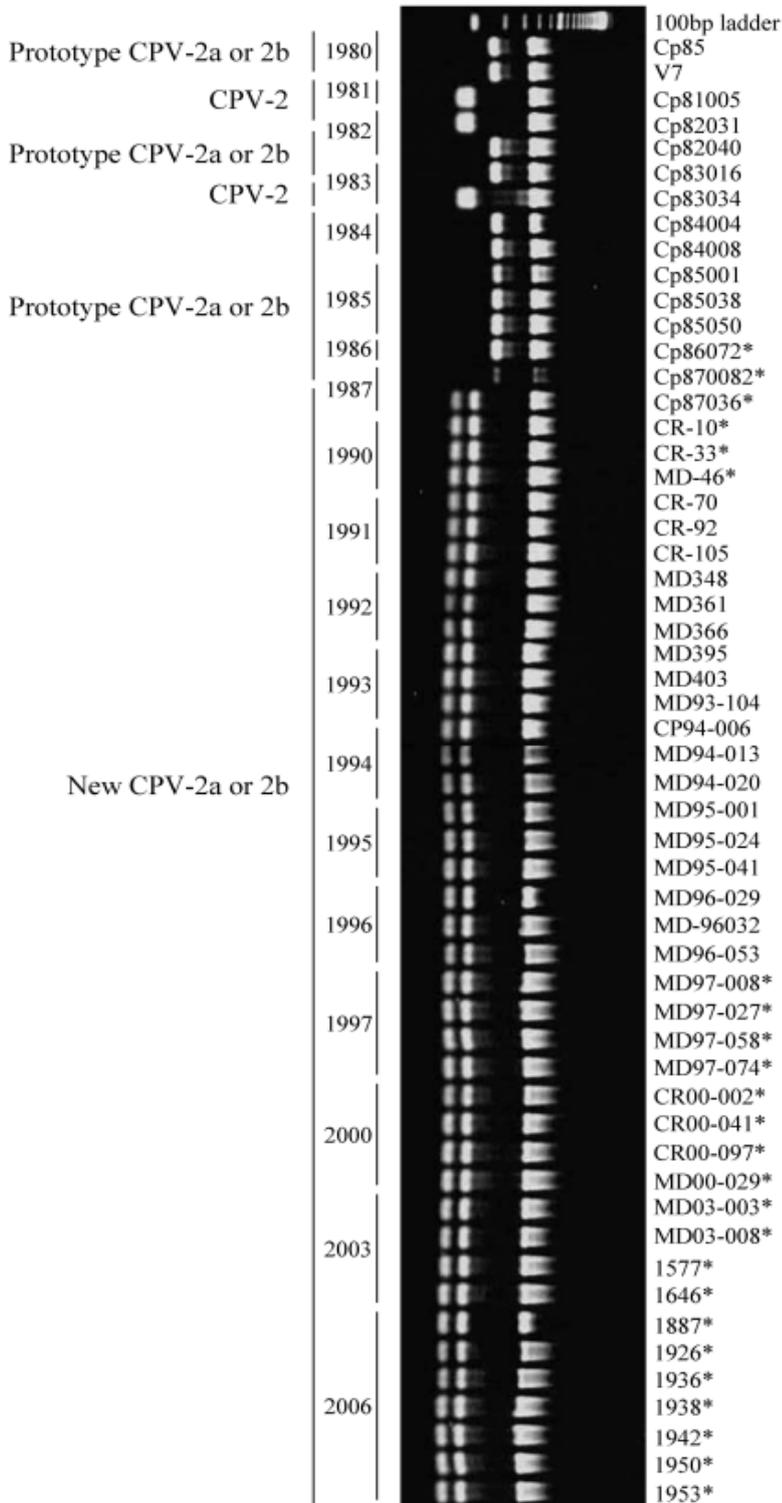


Figure A

|            | 80  | 87  | 93  | 101 | 103 | 297 | 300 | 305 | 323 | 426 | 555 | 564 | 568 |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| FPV        | Lys | Met | Lys | Ile | Val | Ser | Ala | Asp | Asp | Asn | Val | Asn | Ala |
| CPV-2      | Arg | Met | Asn | Ile | Val | Ser | Ala | Asp | Asn | Asn | Val | Ser | Gly |
| CPV-2a     | Arg | Leu | Asn | Thr | Ala | Ser | Gly | Tyr | Asn | Asn | Ile | Ser | Gly |
| CPV-2b     | Arg | Leu | Asn | Thr | Ala | Ser | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly |
| New CPV-2b | Arg | Leu | Asn | Thr | Ala | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asp | Val | Ser | Gly |
| New CPV-2a | Arg | Leu | Asn | Thr | Ala | Ala | Gly | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly |
| Asp-300    | Arg | Leu | Asn | Thr | Ala | Ala | Asp | Tyr | Asn | Asn | Val | Ser | Gly |
| Glu-426    | Arg | Leu | Asn | Thr | Ala | Ala | Gly | Tyr | Asn | Glu | Val | Ser | Gly |

Figure B

### iii. La Polymérisation en chaîne ou PCR

C'est la technique la plus sensible et la plus utilisée. Les autres techniques peuvent donner des résultats négatifs, il arrive que la PCR soit la seule à détecter le virus et donner un résultat positif. Cette technique mise au point dans les années 1980 permet l'amplification d'ADN en quelques heures ( $2^n$  amplifiés au bout de n cycles), l'isolement et le séquençage du génome pour former des banques génomiques. Ainsi, des mutations peuvent être mises en évidence et la génération de sondes pour identifier différentes souches est possible. Elle détecte le virus à partir de 10 particules par ml de prélèvement. Cependant, la PCR demande un matériel de laboratoire précis et elle demande au moins 4 heures.

#### A. Les prélèvements

Les selles sont le prélèvement de choix pour le diagnostic par PCR. L'idéal est un échantillon deux jours après l'apparition des symptômes. Cependant, on peut détecter le virus jusqu'à 10 à 14 jours post-infection. On envoie un échantillon dans un laboratoire pour une analyse PCR afin de mettre en évidence le génome viral. Il faut alors extraire l'ADN à partir des écouvillons fécaux.

Post-mortem, une recherche du virus peut être réalisée dans le contenu intestinal. Une autopsie peut être réalisée afin de mettre en évidence les lésions évocatrices de parvovirose et un prélèvement de 5 à 10% de l'intestin et d'organes lymphoïdes congelés permet un diagnostic de certitude par PCR. On peut encore tenter de quantifier le virus par PCR dans un gramme de fèces. L'inconvénient des prélèvements fécaux est la présence de substances inhibitrices de l'ADN polymérase. Un traitement existe pour éliminer ces substances des échantillons. **DECARO et al. (2005)**

#### B. Principe

La PCR est la première étape obligatoire pour amplifier un fragment de génome que l'on veut analyser. Des techniques de Polymérisation en Chaîne ont été développées pour identifier rapidement le génome du parvovirus canin en décryptant, entre autres, les gènes codant pour VP2, protéine de surface. Par exemple en Italie, 327 échantillons ont été analysés par PCR et PCR en temps réel, au cours de huit années consécutives, pour surveiller l'évolution du virus. **MARTELLA V et al (2005)**

Cette technique utilise les propriétés de l'ADN polymérase, capable de synthétiser la séquence complémentaire d'un ADN servant de matrice. L'amplification nécessite des variations thermiques rapides et fréquentes : la découverte d'une ADN polymérase thermostable issue de la bactérie *Thermus aquaticus*, la Taq polymérase, a permis d'automatiser cette technique. De plus, pour initier le processus, l'ADN polymérase a besoin d'amorces qui s'hybrident avec l'ADN cible grâce à leur séquence complémentaire et se positionnent de part et d'autre de la portion à copier. L'extension des amorces se fait par addition de nucléotides à l'extrémité 3' des amorces. L'ADN polymérase allonge donc les amorces dans le sens 3'=> 5'.

Dans le cas d'un ADN monocaténaire, lors du premier cycle, l'amorce anti-sens s'hybride avec l'ADN et un brin complémentaire du brin initial est synthétisé. Après le premier cycle, on retrouve les conditions de la PCR sur un ADN bicaténaire.

Eléments nécessaires à la PCR :

- des nucléotides : A,T,C,G
- une Taq polymérase et son cofacteur MgCl<sub>2</sub>
- une substance tampon
- deux amorces qui encadrent la partie à amplifier

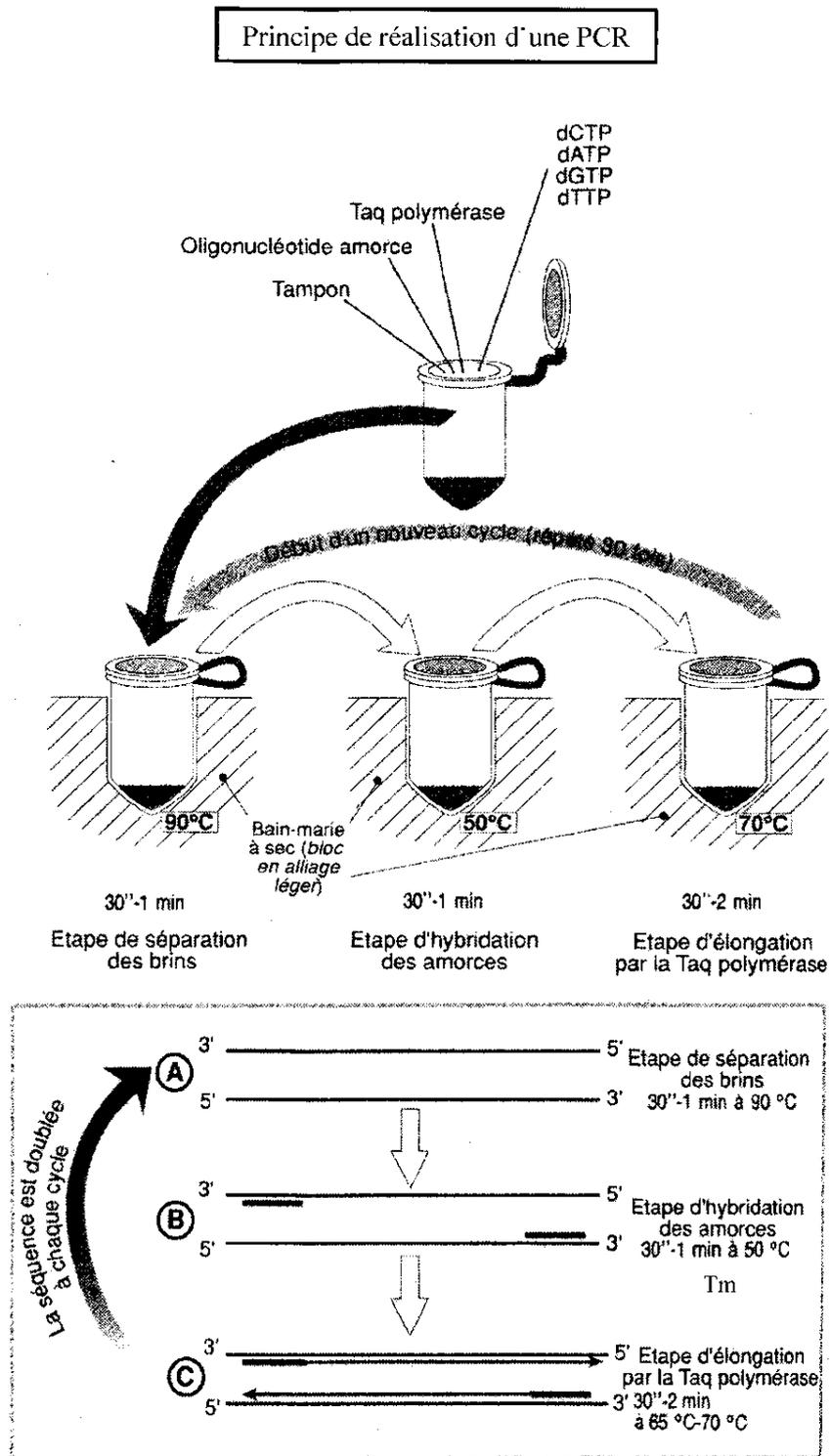
### C. Etapes de la PCR

1. Un échantillon de fèces est homogénéisé dans du PBS (phosphate buffered saline) à pH 7,2 puis il est centrifugé à 1500 tours pendant 15 minutes pour récolter ensuite le surnageant. L'ADN viral est ensuite extrait du surnageant après ébullition pendant 10 minutes puis congelé. L'extraction permet la lyse des cellules et la digestion des protéines associées à l'ADN. Des kits d'extraction sont souvent utilisés. **RIBEIRO M et al (2009)** élabore une nouvelle technique d'extraction de l'ADN à partir du « test de coagulation » (COA test basé sur la propriété de la protéine A de *Staphylococcus aureus* qui peut lier spécifiquement la portion Fc des IgG). La

procédure COA permet l'extraction d'une plus grande quantité d'ADN par rapport aux kits commerciaux. L'ADN est ensuite dilué à 1/10<sup>e</sup> dans de l'eau distillée.

2. L'ADN extrait est parfois testé par un titrage Taqman, lors de PCR en temps réel, capable d'identifier toutes les souches de CPV-2. **DECARO *et al.* (2006 c)**. Différentes séquences de nucléotides sont ajoutées. On choisit souvent un fragment de 583 paires de bases à amplifier dans le génome de VP2 de la position 4003 à 4585, car c'est cette portion qui caractérise les différentes souches de parvovirus.
3. L'amplification est permise par l'activation de l'ADN polymérase (Taq polymérase) qui se fait à 95°C pendant 10 min puis 40 cycles de dénaturation (FIGURE 31 A) à 95°C pendant 15sec sont suivis d'une fixation des amorces à 52°C pendant 30 secondes (FIGURE 31 B) et enfin d'une extension à 60°C pendant 1 minute (FIGURE 31 C). **DECARO *et al.* (2006 c)**. Ce protocole varie suivant les laboratoires.
4. Les produits de la PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et révélés par UV (grâce au BrEt contenu dans le gel). Plus les séquences sont longues, moins elles migrent rapidement. La migration en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire (plasmide découpé par une enzyme de restriction) permet d'identifier chaque produit en fonction du nombre de paires de base qu'il comporte. Si un fragment d'ADN doit être séquencé, il est extrait après cette étape et soumis à un kit de séquençage. Une banque génétique est réalisée pour conserver le génome des différentes souches de CPV. **DOKI M *et al.* (2006)**.

Figure 31 : La technique PCR. D'après Polycopié de Génétique, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (2006/2007)



44

## D. Les différentes techniques PCR

### ➤ La « nested » PCR ou PCR nichée

Cette technique consiste en la réalisation de 2 PCR successives. Elle fait appel à 2 couples d'amorces différents sélectionnés dans les séquences codant pour VP1 et VP2 ou pour les protéines non structurales. Le premier couple d'amorce amplifie donc une séquence puis le deuxième couple amplifie une séquence contenue dans la première séquence. Elle permet, par réamplification interne, d'obtenir un plus grand nombre de fragments. La sensibilité est 10 à 100 fois plus grande d'après **HIRASAWA et al (1996)**, en particulier lorsque les amorces sont sélectionnées dans les séquences codant pour des protéines non structurales. Sa spécificité est également supérieure.

### ➤ La PCR quantitative ou temps réel

La PCR quantitative repose sur la relation de proportionnalité qui existe entre la quantité de produit d'amplification et la quantité d'ADN au départ. Ainsi, la PCR en temps réel permet de mesurer l'accumulation du produit d'amplification. La technologie TaqMan est alors utilisée. Elle associe les propriétés d'ADN polymérase et de nucléases de la Taq polymérase. Une sonde TaqMan, contenant un dérivé de la fluorescéine, est ajoutée au mélange réactionnel. Cette sonde se fixe au milieu de la cible mais ne peut pas être amplifiée. Au cours de l'amplification, l'activité 5'nucléase de la Taq polymérase entraîne l'hydrolyse de la sonde et l'émission de la fluorescence sous une source lumineuse. Ainsi, la révélation se fait en même temps que l'amplification d'où le terme de « temps réel ». De plus, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN, ce qui permet d'estimer la quantité de parvovirus présent dans les selles. Une PCR en temps réel basée sur une technologie MGB spécifique aux sous-types 2a/2b et 2b/2c se développe. **DECARO et al. (2006 a)**.

### ➤ LAMP

Une nouvelle technique LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), décrite par **HO-SEONG C et al. (2006)**, permettrait de réaliser une amplification du génome à partir d'un échantillon fécal et de diagnostiquer une parvovirose en 1heure, avec une application en clinique vétérinaire possible. Une ADN polymérase et 4 amorces qui reconnaissent 6 séquences du génome de VP2, sont utilisées

pour détecter et amplifier le génome d'un parvovirus. Le cycle d'amplification se fait à 63°C pendant 60 minutes. Quand le résultat est positif, un précipité blanc de magnésium pyrophosphate est visible sous lampe UV après migration par électrophorèse sur gel d'agarose du produit de l'amplification. Le test est sensible à 99.9% et spécifique à 76.1%. Il faut au moins 10<sup>-1</sup> virus/mL dans l'échantillon prélevé.

#### E. Le séquençage

Les produits de la PCR amplifiés peuvent être clonés dans des plasmides ou directement séquencés par un analyseur génétique (programme informatique : par exemple ABI PRISM Big Dye Terminator version 3.0 ou ABI prism 377-Perkin Elmer). **OHSHIMA T *et al* en 2008**. Des techniques d'immunofluorescences sont alors capables de détecter la différence d'un nucléotide entre CPV-2a/2b et 2b/2c en utilisant différents fluophores (VIC et FAM). **VIEIRA MJ *et al.* (2008)**. Les nucléotides séquencés sont ensuite soumis aux données de la banque génomique.

#### F. Intérêts

-La PCR est relativement rapide (3H pour l'amplification mais au total 10H en comptant l'homogénéisation, l'extraction et l'électrophorèse) et ne dépend pas de l'intégrité des particules virales.

-Le seuil de détection du virus est de 10<sup>3</sup> PFU/mL (particules formant unité). C'est donc la méthode diagnostique la plus sensible, en particulier pendant les premiers et derniers jours d'excrétion. La PCR en temps réel présente des résultats encore meilleurs : elle détecte à 10<sup>2</sup> copies d'ADN/10uL.

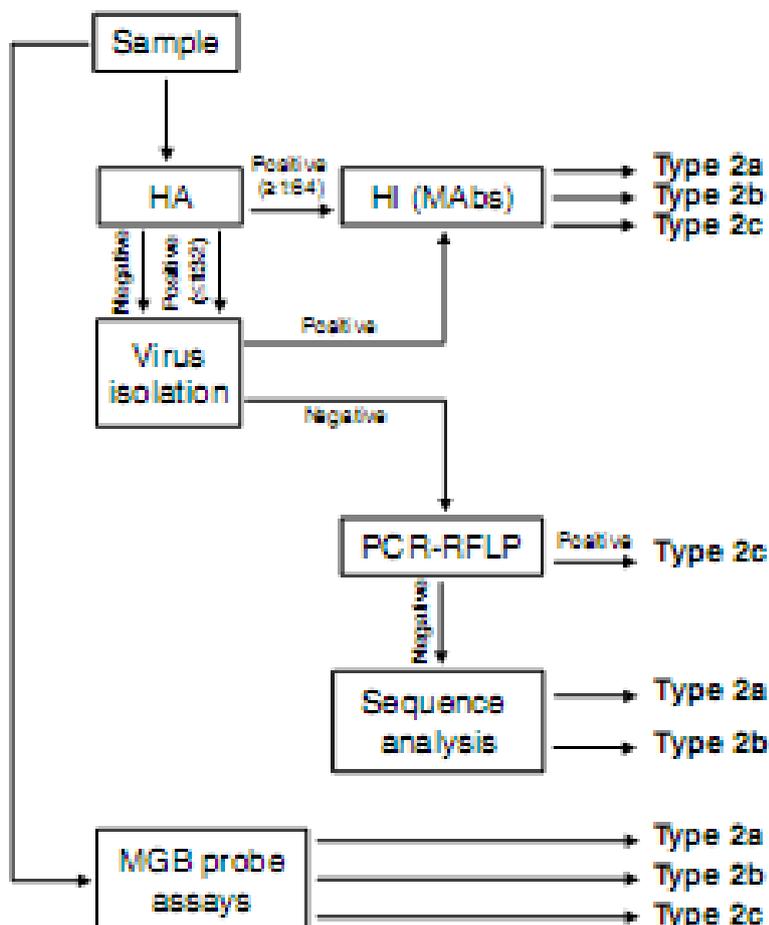
-Cette technique est également très spécifique car on amplifie ce qu'il y a de plus caractéristique chez un virus : son génome.

-La PCR est utilisée pour détecter un faible nombre de particules présentes sur le matériel d'une clinique vétérinaire afin d'éviter les contaminations nosocomiales.

-La PCR est capable de détecter tous les variants de CPV-2. Ceci autorise l'analyse de l'évolution des souches de parvovirus, d'autant plus que la PCR peut amplifier de l'ADN conservé dans des tissus formolés ou incrustés dans de la paraffine depuis 15 ans. Parmi tous les examens de laboratoire disponibles, la PCR reste le choix le plus fréquent. (FIGURE 32)

-Le séquençage permet enfin l'établissement des arbres phylogénétiques en fonction des ressemblances et des différences génétiques. Ils sont construits en utilisant la technique du plus proche voisin et les distances sont calculées par informatique (méthode Kimura).

**Figure 32:** Exemple de stratégie suivie dans le choix des examens de laboratoire pour la caractérisation de CPV-2. D'après **DECARO *et al* (2006 a)**



-On peut encore, grâce à la PCR, différencier les souches de CPV vaccinales ou sauvages présentes dans les selles des animaux considérés. Pour ce faire, des applications MGB sont utilisées. Ce sont de courtes applications TaqMan associées à des molécules qui forment des hyperliens avec l'ADN complémentaire, permettant une réduction de la taille de l'application et une spécificité supérieure. **DECARO *N et al.* (2006 a)**. Ainsi, la PCR est la seule méthode diagnostic pour dépister un animal asymptomatique, en différenciant le virus vaccinal d'un virus contaminant.

### G. Limites

Le problème majeur est l'existence de faux positifs dus à des contaminations externes, en particulier de l'ADN amplifié au cours des manipulations antérieures. En effet, après amplification, les tubes

sont susceptibles de contenir une quantité importante du fragment amplifié. C'est pour cela que la préparation du mélange réactionnel doit être réalisée dans une pièce différente de celle où a lieu l'analyse du produit amplifié. D'autres précautions sont importantes : nettoyage spécifique des paillasses, distribution de l'ADN en dernier dans les échantillons, cônes de prélèvement avec filtre, travail sous hotte à flux laminaire...

Les faux positifs peuvent également être dus à des hybridations non spécifiques des amorces. Pour l'éviter, il faut augmenter la température ou diminuer la concentration en MgCl<sub>2</sub>. Mais la quantité de produit parasite amplifié est généralement faible.

Pour dépister les faux positifs, deux contrôles négatifs sont réalisés : un qui vérifie l'absence de contamination externe ; un autre permet de vérifier la spécificité de l'amplification avec de l'ADN non amplifiable sélectionné à partir des amorces. **CALDERON MG et al. (2009)** mettent en évidence le risque de dénombrer de faux positifs : 4 souches de CPV-2c ont été reconnues comme 2b avant que le séquençage ne révèle la vérité.

De plus, la réalisation d'un PCR représente un coup non négligeable (50 € environ).

#### iv. Hémagglutination

##### A. Principe

On applique les propriétés d'hémagglutination du parvovirus canin sous certaines conditions de température et de pH.

Le résidu 323 de la protéine de capsid VP2 détermine le pouvoir d'hémagglutination.

Le parvovirus canin semble capable d'agglutiner les globules rouges de porc, de singe rhésus et de chat avec une réaction optimale à un PH de 7.2 et à une température de 4°C.

L'hémagglutination permet la détection du virus du 7<sup>e</sup> au 11<sup>e</sup> jour.

Cette propriété est mise à profit pour le diagnostic de la parvovirose :

- ❖ Soit par test d'hémagglutination qui permet de détecter la présence du virus. L'activité d'hémagglutination estime la quantité d'hémagglutinines virales présentes dans les selles et donne donc un diagnostic. L'hémagglutination permet aussi de quantifier le virus par colorimétrie, **TREVOR W et al, (1996)**. Le titre hémagglutinant maximal est obtenu après 4 jours d'incubation et reste constant au-delà de cette limite.
- ❖ Soit par un test d'inhibition de l'hémagglutination qui permet de titrer les anticorps sériques.

On utilise généralement une suspension d'érythrocytes de porcs à 1%. Les érythrocytes de porcs sont les plus faciles à se procurer mais ils s'hémostolysent souvent durant leur conservation et s'agglutinent spontanément pour un pH inférieur à 6,5. Ils peuvent être conservés à 4°C pendant maximum 7 jours.

On récolte le surnageant d'un échantillon de fèces de l'animal suspect de parvovirose, homogénéisé dans du PBS et centrifugé. On mélange le surnageant et la suspension érythrocytaire à volume égal dans des puits. L'ensemble est incubé à 4°C pendant 4h. La solution virale subit des dilutions en série de 2 en 2 (1/2, 1/4, 1/8...). Les résultats sont exprimés en titre hémagglutinant : le titre viral correspond à l'inverse de la dernière dilution qui permet une agglutination totale des érythrocytes de porc. **DECARO *et al.*, (2006 c)**.

### B. Intérêt

L'obtention des résultats est assez rapide, environ 4H. En premier, l'hémagglutination peut être choisie. (FIGURE 32). La sensibilité est de 87% et est meilleure pour de fortes concentrations virales. En effet, à faible concentration virale, des faux négatifs sont induits par les anticorps fécaux qui inhibent la liaison du virus sur les érythrocytes.

Une étude menée par **SAVIC JVEDENIS S *et al.* en 2006** montre la confiance que l'on peut accorder à ce test. Le premier jour de l'apparition des symptômes, le test détecte la présence du virus dans les selles de 100% des chiots malades. Cependant, les jours suivants, la sensibilité décroît. En effet, l'excrétion virale est maximale dans les fèces le premier jour de l'expression des symptômes.

### C. Limites

La spécificité est de 63% c'est pour cela qu'un test d'inhibition de l'hémagglutination complète souvent ce diagnostic car les réactions non spécifiques sont fréquentes (hémagglutinines non virales). Des faux positifs peuvent donc fausser les résultats de ce test. La valeur prédictive positive est de 51% et la valeur prédictive négative est de 93%. Ce test est donc plus fiable dans le cadre d'un diagnostic d'exclusion. **VOLLMER H (2005)**

Cette technique présente une sensibilité inférieure par rapport à la PCR, à l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et à microscopie électronique. Les copro-anticorps inhibant l'hémagglutination engendrent des faux négatifs lors de prélèvements tardifs.

## v. Mise en évidence du virus sur culture cellulaire

Le parvovirus canin CPV2 nécessite l'utilisation de cellules fraîchement sédimentées pour qu'il y ait isolement viral in vitro. Alors qu'il présente une spécificité d'hôte in vivo, il peut être cultivé dans des cellules de Félidés, de Mustélidés, de chien, de souris et d'homme in vitro. (FPV n'est cultivé que dans des cellules de chats ou de visons in vitro). Les sous types 2a et 2b se multiplient in vitro et in vivo chez le chien et le chat. **DECARO *et al.* (2005)**.

### A. Principe

La culture virale sur tapis de cellules est aussi un moyen diagnostique d'identification du parvovirus : pour isoler l'agent infectieux, on fait une culture cellulaire et on observe les éventuels effets cytopathogènes. La lignée cellulaire la plus utilisée est la lignée A72.

A partir de cette culture, on recherche aussi les antigènes viraux par immunofluorescence, identification des inclusions ou séroneutralisation. L'immunofluorescence doit être répétée au moins deux fois si elle est négative pour que le résultat soit interprétable.

Par exemple, on réalise une culture cellulaire canine à 37°C sur laquelle on inocule le surnageant d'un échantillon de fèces homogénéisé, centrifugé et traité aux antibiotiques large spectre pour supprimer les bactéries pouvant interférer avec la culture. Après 5 jours, on teste les cellules par immunofluorescence en utilisant un anti-sérum de chien pour CPV2 conjugué à de la fluorescéine. Les cellules où elles se fixent correspondent aux cellules infectées par le virus **DECARO *et al.* (2006 a)**.

### B. Intérêt

Un des principaux avantages de cette technique est qu'elle met en évidence le virus vivant, pendant qu'il est encore contagieux et qu'il peut détruire les cellules.

### C. Limites

Toutes les souches de CPV ne produisant pas d'effet cytopathique, cette technique doit être complétée inévitablement par l'immunofluorescence. Cette technique est longue, environ 5 à 10 jours, ce qui limite son utilisation. De plus, la PCR est 100 à 1000 fois plus sensible.

## vi. Méthode ELISA

### A. Principe

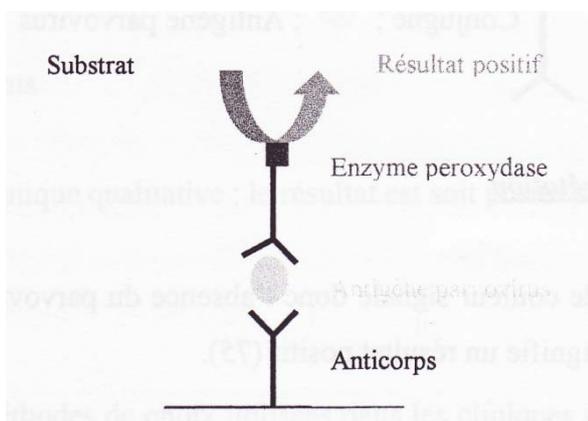
Le prélèvement est un écouvillon fécal dilué dans un tampon fourni par le laboratoire. Post-mortem, un échantillon d'intestin peut aussi permettre un test ELISA.

#### ➤ ELISA « sandwich »

L'antigène viral recherché est pris en sandwich entre 2 anticorps. On utilise le principe de fixation du virus aux anticorps spécifiques. Le premier anticorps est anti-parvovirus, fixant n'importe quel parvovirus présent dans l'échantillon. Une fois l'antigène fixé, le complexe reçoit « un conjugué », c'est-à-dire un deuxième anticorps anti-parvovirus marqué par une peroxydase. L'apport du substrat de cette enzyme révèle la réaction spécifique anticorps-antigène (FIGURE 33). La couleur bleue signale un résultat positif. Il est confronté aux témoins positif et négatif pour vérifier la validité du test.

Il existe un test ELISA sur phase liquide ou solide des selles, utilisant des anticorps monoclonaux ou un antisérum poly clonal, qui permet un diagnostic rapide (FIGURE 35). Ce test a été utilisé dans une étude de **VIEIRA J *et al.* (2008)** pour détecter la présence de parvovirus en clinique chez des chiots. Ces résultats ont été ensuite confirmés par PCR en temps réel et on a donc pu établir une sensibilité pour ce test rapide de 82,76% par rapport à la PCR.

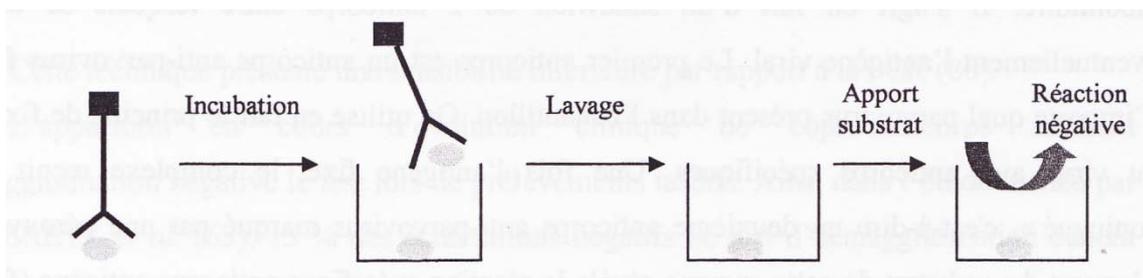
**Figure 33** : Principe du test ELISA direct. D'après **VOLLMER H, (2005)**



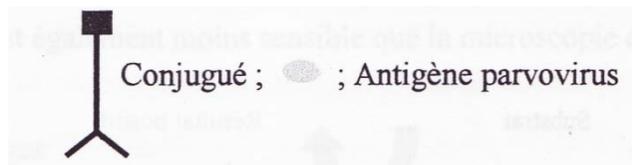
➤ ELISA compétitif

L'échantillon de matières fécales est mélangé avec une quantité suffisante de conjugué. Après une courte incubation, le mélange est transféré dans un puits sur lequel est fixé des antigènes du parvovirus canin. Si l'échantillon à tester contient du parvovirus, le conjugué s'est fixé au virus et il n'est plus disponible pour réagir avec l'antigène fixé sur les puits. Le puits est nettoyé pour éliminer les conjugués non fixés et le substrat de l'enzyme est ajouté. Un changement de couleur signale donc l'absence du parvovirus canin. **VOLLMER H, (2005).** ( FIGURE 34)

Figure 34 : Principe du test ELISA compétitif. D'après VOLLMER H, (2005)



Légende :



## B. Intérêt

La méthode ELISA compétitrice présente une meilleure sensibilité que le test sandwich et une meilleure reproductibilité. Le seuil de détection est de  $10^4$  à  $10^5$  DCIT<sub>50</sub> soit un titre hémagglutinant compris entre 320 et 640. La sensibilité est de 87%. **VIEIRA J et al. (2008)**

C'est l'une des méthodes de choix utilisées dans les cliniques vétérinaires. Le support présenté sous forme de kit est adapté pour les praticiens.

Un « canine parvovirus test kit » ayant une bonne spécificité vis-à-vis des parvovirus canin, félin, porcine, bovine et ovine a été élaboré par **LACHRETZ A et LEJOUR A (1990)**. De plus, il n'y a pas de réaction croisée avec le virus de la maladie de Carré, les Leptospires ou avec l'hépatite de Rubarth. Ce test rapide est SNAP parvo antigen test (Idexx), basé sur des anticorps pouvant détecter les antigènes de CPV à partir d'échantillons fécaux. Le résultat est disponible en 15 min, ce qui permet la mise en place d'un traitement précoce. De plus, cette technique fiable ne dépend ni de la

viabilité des virus ni de ses propriétés hémagglutinantes. Les résultats sont clairs et faciles à interpréter, le coût reste raisonnable : pour SNAP PARVO, les 5 tests par coffret peuvent être conservés à température ambiante et représentent un coût de 78,49 € soit 15 € par test. (FIGURE 35)

**Figure 35** : Snap parvo, test rapide. D'après **IDEXX laboratories, (2007)**



**SCHMITZ S et al (2009)** tente d'évaluer la confiance que l'on peut accorder à ces tests en comparant leurs résultats de chaque type de test rapide (SNAP parvo antigen test, FASTest parvo strip et Witness parvo card) à ceux d'une PCR et d'une visualisation par microscopie électronique. La spécificité se révèle bonne (92.2 à 100%) alors que la sensibilité apparaît comme médiocre avec 15.8 à 26.3%. Ces tests sont donc intéressants dans le cadre d'un diagnostic différentiel de gastro-entérite. Si le résultat est positif, l'animal a probablement une parvovirose mais une confirmation par PCR est tout de même conseillée. Si le test est négatif, on ne peut pas exclure cette maladie. L'on doit alors reconsidérer le tableau clinique mais surtout réaliser obligatoirement une PCR pour pouvoir assurer que l'animal n'est pas infecté par le parvovirus.

### C. Limites

Un risque de faux négatifs est connu pour ces tests rapides dont le résultats doit alors toujours être confirmé par un test de laboratoire.

Il existe, dans de rares cas, des faux positifs dus à la présence d'une activité enzymatique intrinsèque aux matières fécales. C'est une technique qualitative uniquement.

## vii. Immunofluorescence directe

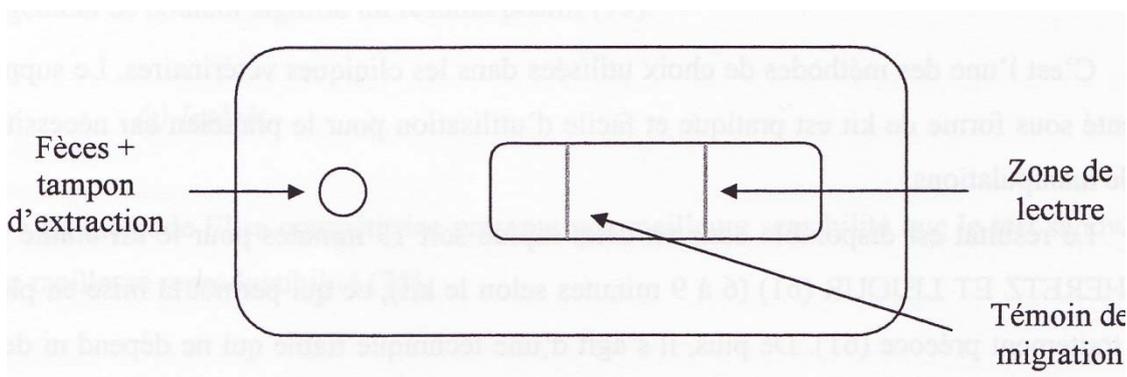
C'est la technique la plus utilisée en clientèle dans les kits PARVOCAN ou FASTest parvo strip. Le principe est le même que pour l'ELISA sauf que le conjugué est lié à une molécule fluorescente. Une étude menée par **SAVIC JVEDENIS S *et al.*** en **2006** montre la confiance que l'on peut accorder au PARVOCAN test. Le premier jour d'apparition des symptômes, le test détecte 100% des chiots malades. Le deuxième jour, il ne détecte plus que 53% et le jour ante-mortem, il détecte la présence du virus chez 15% des chiots malades.

## viii. Immuno-migration rapide sur membrane

### A. Principe

Un test rapide par immuno-migration sur membrane peut être effectué sur écouvillon rectal : le WITNESS CPV (Synbiotics Corporation, Lyon, France). **VIEIRA J *et al.*** (2008). L'échantillon de selles est dilué dans 1 mL de tampon puis soumis à migration. L'échantillon à tester est mis au contact de particules d'or colloïdal sensibilisées. Les complexes formés avec les antigènes migrent sur une membrane et sont capturés sur une zone de réaction. Leur concentration provoque l'apparition de bandes colorées. Un témoin de migration se colore en rose si le test a fonctionné et une zone de lecture se colore si le test est positif (FIGURE 36).

**Figure 36** : Test d'immunochromatographie. D'après **VOLLMER H,** (2005)



### B. Intérêt

Ce test est aussi fiable que le test ELISA mais il présente l'avantage de ne pas être soumis à une activité enzymatique dans le prélèvement fécal. Le seuil de détection est aussi de  $10^4$  à  $10^5$  DCIT<sub>50</sub>. Les échantillons de selles peuvent être conservés à la température ambiante pendant 24H ou à 2°C pendant 7 jours.

Ce test est rapide : 10 min. La sensibilité est bonne pendant une période de 3 jours environ, soit au pic clinique. Il semble donc adapté pour un diagnostic précoce en clientèle lors du premier stade de l'infection. Il doit cependant être complété par un autre test plus sensible et spécifique.

### C. Limites

Des faux négatifs sont là encore fréquents et doivent être détectés par une vérification des résultats à l'aide d'une PCR.

La validité du test est compromise par l'absence de témoin négatif, une contamination extérieure ne peut être exclue. Des faux positifs peuvent donc apparaître. La trousse doit être conservée à température ambiante. Le test doit être utilisé dans les 10 minutes suivant son ouverture et la membrane ne doit pas être touchée. Le test doit être réalisé sur une surface horizontale.

### ix. Histologie

Des marqueurs fluorescents spécifiques du parvovirus mettent en évidence la présence du virus au niveau de la muqueuse intestinale. Le diagnostic histologique est possible pour les formes suraigües mais c'est une technique contraignante : les intestins doivent être prélevés et fixés dans du liquide de Bouin rapidement après la mort. Les inclusions recherchées n'apparaissent souvent que tardivement.

Une étude menée par **SAVIC JVEDENIS S *et al.*** en **2006** montre la confiance que l'on peut accorder à ce test. Il est réalisé en règle générale lors de l'autopsie. Il est assez sensible et très spécifique et permet donc un diagnostic post-mortem. (FIGURE 37)

**Figure 37** : Apparence caractéristique de l'intestin grêle marqué par immunofluorescence chez un animal atteint de parvovirus. D'après **SAVIC JVEDENIS S et al. (2006)**



*c. Diagnostic indirect*

Ces tests sont actuellement peu utilisés pour la réalisation de diagnostics cliniques et sont plutôt utilisés lors d'études expérimentales. La limite principale de ces tests est l'interférence avec les anticorps vaccinaux.

i. Inhibition de l'hémagglutination

A. Principe

L'objectif est de réaliser une cinétique des anticorps inhibant l'hémagglutination et de mettre en évidence une séroconversion. Cette technique n'est pas indiquée pour évaluer la protection fournie par le système immunitaire contre les variants de CPV-2. Elle permet plutôt de caractériser les souches virales. Ainsi, le typage antigénique du parvovirus peut être mis en évidence par inhibition de l'hémagglutination avec des anticorps monoclonaux (A4B3, B4A2, C1D1 et B4E1). Les anticorps monoclonaux sont spécifiques du résidu 93 de la protéine de capsid VP2. **GANIERE et al. (2000)**. Le Parvovirus forme des complexes avec environ 60 fragments d'un anticorps neutralisant. Les anticorps neutralisants agissent en provoquant l'agrégation des capsides. Si le résultat est positif, l'individu est infecté ou il a été au contact du virus.

Il faut réaliser deux prises de sang à 15 jours d'intervalle pour que le titrage en anticorps soit significatif. Un seul échantillon positif peut-être du à des anticorps maternels résiduels ou à des

anticorps post-vaccinaux. Une augmentation signe une infection en cours ou une diminution signe la guérison.

## B. Méthode

Le sérum de l'animal à tester est absorbé sur une suspension d'érythrocytes de porc dans du PBS (phosphate buffered saline). Une quantité d'antigène viral titrée à 4 unités hémagglutinantes est ajoutée. Le mélange est incubé une heure à température ambiante puis une suspension d'érythrocytes glacés est ajoutée. L'ensemble est incubé une nuit à une température de 2 à 4°C. Le titre IHA est l'inverse de la dernière dilution du sérum permettant l'inhibition complète des 4 unités hémagglutinantes.

Les anticorps apparaissent au plus tard 2 jours après les signes cliniques et sont détectables dans le sérum à partir du 5<sup>e</sup> jour post-infection ce qui semble coïncider avec le pic de température et l'expression des signes cliniques. Une étude de **POLLOCK R. (1982)** montre que la moitié des chiens inoculés par voie parentérale présentent un test IHA positif dès le 3<sup>e</sup> jour et tous les chiens sont positif au 4<sup>e</sup> jour. Chez les chiens infectés par voie oro-nasale, les tests IHA sont positifs au 5<sup>e</sup> jour. Le titre IHA est maximal entre le 7<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> jour après infection.

Une étude menée par **MOON H *et al* (2008)** en Corée permet d'analyser l'évolution du titre en anticorps par comparaison des titres d'inhibition de l'hémagglutination chez des chiots non vaccinés à qui ont été inoculés des souches de CPV-2a ou 2b. (FIGURE 38). On constate alors un titre en anticorps nul jusqu'à 4 jours après l'apparition des symptômes. Puis le titre en anticorps augmente avec la rémission des symptômes chez les survivants ou juste avant la mort des victimes soit entre 5 et 8 jours post-infection. Les titres en anticorps les plus élevés et les plus précoces sont constatés chez les chiots infectés par CPV-2b, souche qui engendre la létalité la plus faible. Cependant, l'on remarque que les chiens 3 et 4 infectés par CPV-2b-I conservent un titre en anticorps faible et montrent quelques signes cliniques tardifs. Aucune explication n'est communiquée par l'auteur.

**Figure 38** : Comparaison des titres d'inhibition de l'hémagglutination chez des chiens inoculés avec différents variants de CPV-2. D'après **MOON H *et al* (2008)**

| Type                                  | Day |    |    |     |  |     |     |     |     |                        |     |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------|-----|----|----|-----|--|-----|-----|-----|-----|------------------------|-----|------|------|------|------|------|
| 2a-I                                  | 0   | 1  | 2  | 3   | 4  | 5   | 6   | 7   | 8   | 9                      | 10  | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   |
| 1                                     | 0   | 0  | 0  | 10  | 10   | 20  | 10  | 10  | 160 |                        |     |      |      |      |      |      |
| 2                                     | 0   | 0  | 10 | 20  | 40   | 80  | 80  | 160 | 320 | 640                    | 640 | 640  | 640  | 1280 | 1280 | 1280 |
| 3                                     | 0   | 0  | 0  | 0   | 0  | 10  | 20  | 80  | 80  | 160                    | 320 | 320  | 320  | 640  | 640  | 640  |
| 4                                     | 0   | 0  | 0  | 0   | 0  | 0   | 0   | 160 | 320 |                        |     |      |      |      |      |      |
| 5                                     | 0   | 0  | 0  | 0   | 0  | 10  | 10  | 10  | 80  |                        |     |      |      |      |      |      |
| 2a-V                                  |     |    |    |     |  |     |     |     |     |                        |     |      |      |      |      |      |
| 1                                     | 0   | 10 | 10 | 10  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0                      | 0   | 80   | 80   | 40   | 40   | 40   |
| 2                                     | 0   | 20 | 20 | 10  | 20   | 20  | 10  | 10  | 10  | 10                     | 10  | 160  |      |      |      |      |
| 3                                     | 0   | 0  | 0  | 0   | 0  | 0   | 0   | 80  | 320 | 320                    |     |      |      |      |      |      |
| 4                                     | 0   | 0  | 10 | 0   | 0  | 0   | 160 |     |     |                        |     |      |      |      |      |      |
| 5                                     | 0   | 0  | 0  | 10  | 10   | 10  | 10  | 10  | 160 |                        |     |      |      |      |      |      |
| 2b-I                                  |     |    |    |     |  |     |     |     |     |                        |     |      |      |      |      |      |
| 1                                     | 0   | 20 | 80 | 160 | 320  | 640 | 640 | 640 | 640 | 640                    | 640 | 1280 | 160  | 160  | 160  | 160  |
| 2                                     | 0   | 0  | 0  | 0   | 160  | 320 | 640 | 640 |     |                        |     |      |      |      |      |      |
| 3                                     | 0   | 10 | 10 | 20  | 20   | 20  | 10  | 0   | 0   | 0                      | 0   | 0    | 10   | 10   | 10   | 10   |
| 4                                     | 0   | 40 | 20 | 20  | 20   | 10  | 10  | 10  | 10  | 10                     | 10  | 20   | 20   | 20   | 10   | 20   |
| 5                                     | 0   | 0  | 0  | 10  | 10   | 10  | 160 | 320 | 320 | 640                    | 640 | 1280 | 1280 | 1280 | 640  | 640  |
| No direct evidence for clinical signs |     |    |    |     | Direct evidence for clinical signs (Watery diarrhea) |     |     |     |     | Death by CPV infection |     |      |      |      |      |      |

### C. Intérêt

L'IHA est un peu moins sensible que le test ELISA. La sélection d'anticorps monoclonaux ne se fixant que sur les épitopes spécifiques d'une souche de parvovirus, cette technique permet de distinguer les sous-types.

## ii. Séroneutralisation

Cette technique se base sur la capacité des anticorps séroneutralisants à inhiber l'infection de cellules sensibles au parvovirus canin. L'effet neutralisant du sérum à tester est comparé à celui d'un sérum hyperimmun.

La séroneutralisation (SN) semble être une technique plus performante que l'hémagglutination par inhibition qui n'évalue pas le réel statut immunitaire. **PRATELLI A et al. (2001)** montre dans une étude visant à comparer la réponse immunitaire face à un vaccin à base de CPV-2 et de CPV-2b que la séroneutralisation met en évidence une différence des titres en anticorps jusqu'à 30 fois supérieure entre les deux vaccins, ce que n'avait pas révélé l'IHA.

Elle est plus sensible mais plus coûteuse. Elle permet aussi de différencier les souches à l'aide d'anticorps monoclonaux. (FIGURE 32)

## iii. Immunofluorescence indirecte

Le principe est le même que celui de l'immunofluorescence directe mais ce sont les anticorps qui sont détectés.

## 4. Examens de laboratoire adaptés au sous-type 2C

### a. *Typage des souches*

Un anticorps monoclonal capable de distinguer les souches CPV-2c et 2b a été développé **NAKAMURA et al, (2004)**. Il est possible que la mutation Trh/Ala permette de mettre en évidence rapidement le CPV-2c.

### *b. Inhibition de l'Hémagglutination*

L'inhibition de l'hémagglutination ou la neutralisation à l'aide d'anticorps monoclonaux permettent de distinguer chaque souche virale car chaque anticorps réagit différemment avec les différentes souches. Un anticorps monoclonal spécifique d'une souche donne un fort titre d'inhibition de l'hémagglutination et permet le typage de la souche. (FIGURE 32)

La découverte de CPV-2c a été permise car cette souche était la seule à ne pas réagir ou à peu réagir avec les anticorps monoclonaux déjà connus mis en contact lors d'un test d'inhibition de l'hémagglutination. (TABLEAU 9) **MARTELLA V *et al.* (2003)**.

Des études menées dans les années qui suivirent par **NAKAMURA M *et al.* en 2003** ont permis le développement de nouveaux anticorps monoclonaux spécifiques de CPV-2c pour pouvoir différencier ce sous-type des autres. Pour ce faire, des souches du virus CPV-2c sont inoculées par voie intraveineuse et intra péritonéale à des souris puis des cellules de leur rate sont prélevées trois jours plus tard. Les anticorps monoclonaux sécrétés par ces cellules sont alors identifiés et leur réaction en présence des souches de parvovirus est étudiée lors d'inhibition de l'hémagglutination. Trois groupes d'anticorps monoclonaux ont été établis : Mab 2G5 et 20G4 reconnaît CPV-2a, 2b et 2c ; Mab 21C3 reconnaît CPV-2b et 2c. Mab 20G4 réagit 20 fois plus avec CPV-2c qu'avec les autres sous-types, il est donc considéré comme l'anticorps monoclonal spécifique de CPV-2c et permet de rechercher sa distribution. Aujourd'hui, il est donc possible de différencier les différentes souches CPV-2, 2a, 2b et 2c en les soumettant à un panel d'anticorps monoclonaux lors d'une hémagglutination par inhibition.

Les épitopes reconnus par ces anticorps monoclonaux ont été étudiés. Les mutations ayant modifié les épitopes sur le site A ou B (mutation des acides aminés 426 et 300) expliquent les variations de réactivité des souches avec les différents anticorps.

**Tableau 9** : Identification de CPV-2c par la réaction d'anticorps monoclonaux (MABs) sur CPV-2, 2a, 2b et du nouveau sous-type (CPV-2 ?) avec la technique d'hémagglutination par inhibition. D'après **MARTELLA V *et al.* (2003)**.

| Isolate     | Reactivities of MABs <sup>a</sup> |        |           |       | Antigenic type, amino acid change |
|-------------|-----------------------------------|--------|-----------|-------|-----------------------------------|
|             | A4E3                              | B4A2   | C1D1      | B4E1  |                                   |
| DP/83       | 160                               | 160    | 0         | 1,280 | CPV-2, Asn-426                    |
| 188-01 (B)  | 640                               | 80-160 | 1,280     | 40    | CPV-2a, Asn-426                   |
| 108-02 (44) | 640                               | 80-160 | 2,560     | 20-40 | CPV-2a, Asn-426                   |
| 119-02 (A)  | 640                               | 80     | 1,280     | 20-40 | CPV-2a, Asn-426                   |
| 42-01       | 2,560                             | 0      | 2,560     | 20-40 | CPV-2b, Asp-426                   |
| 198-02 (A)  | 640                               | 0      | 1,280     | 0     | CPV-2b, Asp-426                   |
| 205-02      | 1,280                             | 20     | 1,280     | 10    | CPV-2b, Asp-426                   |
| 56-00       | 320                               | 0      | 1,280     | 20    | CPV-2?, Glu-426                   |
| 136-00      | 1,280-2,560                       | 5-10   | 2,560     | 20    | CPV-2?, Glu-426                   |
| 157-02 (5)  | 320                               | 0      | 640-1,280 | 20-40 | CPV-2?, Glu-426                   |
| 202-02 (1)  | 160                               | 0      | 640       | 20    | CPV-2?, Glu-426                   |
| 202-02 (1)  | 160                               | 0      | 640       | 20    | CPV-2?, Glu-426                   |

<sup>a</sup>Values indicate the reciprocal of the highest dilution of MAB inhibiting eight hemagglutination units of the virus. MAB specificities are as follows: A4E3 for CPV-2, CPV-2a, and CPV-2b; B4A2 for CPV-2 and CPV-2a; C1D1 for CPV-2a and CPV-2b; and B4E1 for CPV-2.

De même, des anticorps monoclonaux spécifiques de Asp-300, mutation moins répandue, ont été générés et sont aujourd'hui utilisés, en particulier chez les chats du sud-est asiatique chez qui cette mutation est présente. **MARTELLA V *et al.* (2006)**

#### *c. Mise en culture*

Le type 2c peut être détecté par mise en culture de surnageant de fèces du jour 6 au jour 13. La détection de CPV-2c se fait ensuite par marquage en immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux des cellules infectées.

#### *d. PCR*

L'apparition des « nouveaux CPV-2a et 2b » ainsi que de CPV-2c a remis en question les valeurs des résultats PCR.

En effet, CPV-2b ne pouvait être différencié de CPV-2c donc il a été surestimé durant plusieurs années. De même, le « nouveau CPV-2a », présent uniquement en Asie, a été confondu avec CPV-2b pendant des années. D'autres mutants mineurs ont donc pu passer inaperçus. **MARTELLA V *et al.* (2006)**.

Des méthodes PCR spécifiques ont du être développées car un séquençage est nécessaire pour distinguer CPV-2c de CPV-2b. La PCR–restriction fragment-length polymorphism (RFLP) est aujourd’hui utilisée avec une enzyme de restriction MBOII capable de distinguer CPV-2c. Récemment, deux MGB ont été développés et sont capables de reconnaître les différentes séquences de nucléotides entre tous les variants de parvovirus.

De même, **DECARO *et al.* (2006 c)** développe une PCR en temps réel basée sur des MGB capables de différencier les souches CPV des souches FPV chez le chat. Les MGB utilisées sont capables de se fixer à la séquence parfaitement complémentaire de CPV-2c à la position 3753 du génome viral (résidu 323 de la protéine de capsid VP2) et donc de différencier CPV-2c de FPV même lorsque les deux virus sont présents dans l’échantillon. Cette technique est sensible, spécifique et reproductible. Elle permettra de connaître plus précisément la circulation de CPV-2c dans les populations félines à partir d’échantillons fécaux.

Le CPV-2c peut être détecté du jour 4 au jour 54 après infection, par PCR. La quantité de virus la plus importante semble présente vers le 10<sup>e</sup> jour avec un titre de  $5,49.10^{10}$  copies d'ADN/mg de fèces **DECARO *et al.* (2005)**.

Il semble que CPV-2c soit contagieux plus longtemps car il reste un grand nombre d'ADN dans les selles au bout de 45j. De plus, la PCR en temps réel détecte le génome viral et pas uniquement les particules virales infectieuses.

## **CONCLUSION**

Ainsi, CPV-2a serait la souche actuelle la plus pathogène chez le chien, bien que la virulence de CPV-2c soit controversée dans les différentes régions du monde. Chez les chats, CPV-2c est clairement pathogène et engendre un tableau clinique varié.

Il est donc important face à cette maladie rapidement et fréquemment mortelle, de réaliser un diagnostic de certitude. Les récents tests en kit pouvant être utilisés en clientèle semblent intéressants mais il reste évident que la PCR est plus sensible, comparé aux autres techniques qui ne mettent le virus en évidence que pendant 5 à 6 jours et qui sont moins spécifiques. Cependant, la PCR reste un examen long, or le traitement doit être mis en place le plus rapidement possible pour augmenter les chances de survie.



## **TROISIEME PARTIE**

### **Thérapeutique et Prophylaxie instaurées face aux différentes souches de parvovirus canin**



## I. TRAITEMENTS ET PRONOSTIC

### 1. Traitement médical symptomatique

Le traitement médical consiste principalement en un traitement symptomatique pour éviter les pertes protéiques et hydriques souvent responsables de la mort des animaux atteints. L'animal est placé en soins intensifs mais isolé des autres animaux, dans un chenil pour les contagieux. Les soigneurs doivent respecter strictement les règles d'hygiène relatives aux maladies contagieuses dès qu'il y a suspicion de parvovirose.

Le traitement est fondé essentiellement sur la réanimation médicale commune aux diarrhées aiguës, aux vomissements et à la déshydratation. **MORAILLON A (1982)**:

- Une diète hydrique d'au moins 24H permet de laisser les organes digestifs au repos. L'alimentation peut être reprise progressivement lorsque l'état de l'animal le permet. Les repas, hyper digestes et pauvres en graisses, doivent être fractionnés et donnés en petite quantité. Si l'animal refuse de s'alimenter, une sonde naso-oesophagienne peut permettre un gavage régulier.
- Une réhydratation par voie parentérale doit être mise en place impérativement. L'état d'hydratation est apprécié par la persistance du pli de peau et l'enfoncement des globes oculaires. Une augmentation de l'hématocrite signe également une déshydratation. Le choix du soluté perfusé se fait en fonction de l'ionogramme et du type de déshydratation (intra ou extracellulaire). L'animal est perfusé le plus souvent avec du NaCL 0.9% complétement en potassium en fonction de la kaliémie ou avec du Ringer Lactate. Le débit correspond à son débit d'entretien (60ml/kg/h) plus celui pouvant compenser le pourcentage de déshydratation de l'animal et les pertes estimées.
- Un des anti-émétiques suivant est administré au moins deux fois par jour :
  - *Métoclopramide (PRIMPERID®)*, anti-vomitif central et périphérique (gastrokinétique), à la posologie de 1 à 2 mg/kg/j en perfusion ou 0,1 à 0,5 mg/kg trois fois par jour IM ou SC ou ½ comprimé /10kg trois fois par jour PO.

- *Métopimazine (VOGALENE®)*, anti-vomitif central (dérivé des phénotiazines), à la posologie de 0,25 à 1 mg/kg deux fois par jour PO, IV, IM.
  - *Dompéridone (MOTILIUM®)*, anti-vomitif central et périphérique, à la posologie de 0,5 mg/kg deux fois par jour PO.
  - *Bromure de Prifinium (PRIFINIAL®)*, anti-vomitif périphérique et anti-diarrhéique (anti-cholinergique), à la posologie de 1 mg/kg/j IV, IM, SC ou 5mg/kg/j PO.
- Des anti-diarrhéiques sont parfois administrés mais leur utilisation est déconseillée par les gastro-entérologues car la diarrhée n'est pas due à une augmentation de péristaltisme lors de parvovirose or ils inhibent les contractions péristaltiques, ce qui augmente la durée du transit.
- Des anti-acides type *Ranitidine (AZANTAC®)*, 10mg/kg) ou *Cimétidine (TAGAMET®)*, 0,5à 2 mg/kg) sont administrés IV ou PO deux à trois fois par jour.
- Les pansements gastriques sont largement utilisés mais n'ont pas prouvé leur efficacité dans ce genre d'affection :
- *Phosphate d'aluminium (PHOSPHALUVET®)*, pouvoir adsorbant, protecteur de muqueuse gastrique, lutte contre l'hyperacidité, à la posologie de 1 mL/kg trois fois par jour PO.
  - *Sucralfate (ULCAR®)*, cytoprotecteur, à la posologie de 1/2 à 1 comprimé ou sachet trois fois par jour PO.
- Un pansement intestinal est donné PO pour stopper la diarrhée :
- *Kaolin Pectine (KAOPECTATE®)*, pouvoir adsorbant des virus et des toxines bactériennes, protecteur de muqueuse intestinale, à la posologie de 5 à 30 mL en fonction du poids de l'animal deux fois par jour PO.
  - *Smectites (SMECTA®, DIARSANYL®)*, pouvoir adsorbant des virus et des toxines bactériennes, absorption des liquides, pansement intestinal, à la posologie de 1 sachet pour 10 kg ou 1 à 10mL par animal deux fois par jour PO.
- Une antibiothérapie large spectre (*Céfalexine* 15mg/kg deux fois par jour ou *amoxicilline et acide clavulanique* 12,5mg/kg deux fois par jour ou *gentamycine* 2 à 4

mg/kg deux fois par jour) est donnée par voie générale pour limiter les surinfections par passage des bactéries à travers la muqueuse intestinale. En effet, des bactéries comme *E. coli* sont régulièrement isolées dans les sérums de chiens atteints de parvovirose.

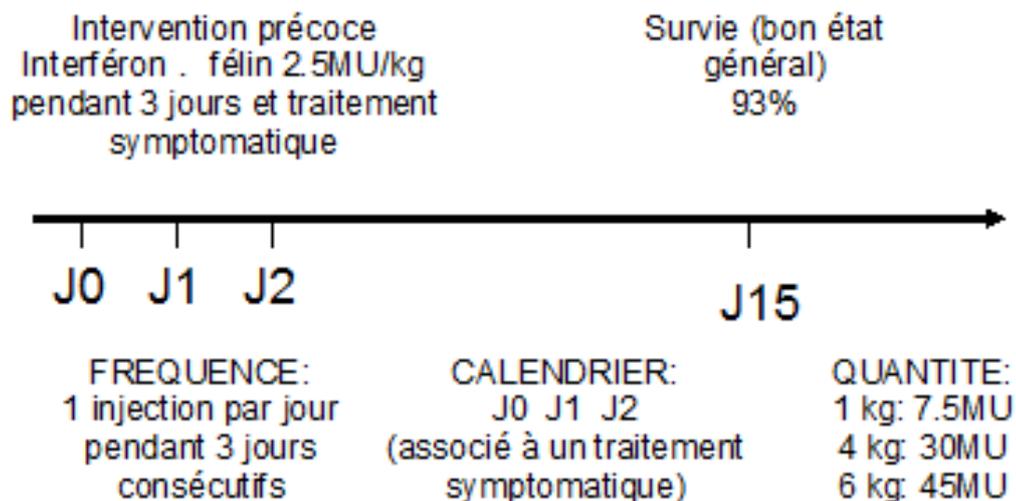
Un antibiotique local type *Métronidazole* (*FLAGYL*®) peut être administré par voie rectale ou orale trois fois par jour à la posologie de 2,5mg/kg pour limiter les surinfections.

- L'utilisation d'AINS n'est préconisée qu'en cas de forte probabilité de septicémie ou de choc endotoxinique, une fois la volémie rétablie.
- L'utilisation de sérum anti-endotoxines est controversée. **DIMMIT R. (1991)** a montré une corrélation significative entre le taux de survie des chiots atteints de parvovirose et le traitement avec du sérum anti-endotoxine d'origine équine (*ENDOSERUM*®, *IMMVAC*®). La posologie optimale est de 2ml/kg et le sérum doit être administré simultanément à la prise d'antibiotiques. Il existe un risque de choc anaphylactique, limité si le sérum est injecté lentement et dilué. Il semblerait que les anticorps anti T.N.F.alpha participent aussi aux effets bénéfiques.
- L'administration d'un sérum hyper-immun issu de chiens guéris de la parvovirose doit encore faire l'objet de recherches. La meilleur source est un chien sain ayant été affecté par le parvovirus six mois plus tôt. Il est administré à la posologie de 8 à 10 ml/kg IV. Il est recommandé chez les races à risque telles que le Rottweiler.
- L'administration du facteur humain « granulocyte-colony stimulating factor » ou G-CSF (*NEUPOGEN*®), à la posologie de 5µg/kg/j en SC deux à trois fois, est indiqué dans les cas sévères de neutropénie. Il est utilisé par exemple chez des patients subissant une chimiothérapie ou atteints de HIV. Il permet la mobilisation des cellules souches progénitrices dans le sang circulant. Ce traitement controversé permettrait de diminuer le taux de mortalité et la durée d'hospitalisation des chiens mais son coût est élevé (130€). **MONET E. (2001)**

## 2. Traitement antiviral

Un traitement à l'interféron oméga (IFN  $\Omega$ ) est de plus en plus utilisé à la posologie de 2.5Millions d'unités/kg/j pendant 3 j en IV chez des chiots de 1 mois ou plus. (FIGURE 39). Il est efficace mais très coûteux. Attention, il ne faut pas vacciner pendant et après le traitement jusqu'à un rétablissement complet de l'animal. L'IFN  $\Omega$  est une cytokine avec une glycoprotéine monomérique dont la structure est proche des IFN  $\beta$  et  $\alpha$ . Le mode d'action n'est pas parfaitement connu mais il pourrait impliquer l'augmentation des défenses non spécifiques de l'organisme. Il agit par inhibition des mécanismes de réplication interne des cellules infectées en détruisant l'ARNm viral et en inactivant les protéines nécessaires à la traduction. **MARTIN V *et al.* (2002)** ont étudié l'efficacité thérapeutique de l'interféron dans une expérimentation en double-aveugle sur 10 chiens atteints de parvovirose après inoculation. Les chiens traités à l'interféron montraient alors une amélioration significative de leur score clinique et recouvraient rapidement leurs poids initiaux. De plus, l'interféron  $\Omega$  permet de réduire par 3 ou 4 le taux de mortalité et encore plus chez les animaux non vaccinés. Il n'y a pas d'effet secondaire mais le frein reste son prix élevé.

**Figure 39** : Protocole de traitement à l'interféron Oméga Félin. D'après **VIRBAC Virbagen ND**.



**ISHIWATA K *et al.* (1998)** montre les effets cliniques de l'IFN  $\Omega$  recombinant du chat chez des chiots de 3 à 4 mois infectés expérimentalement par CPV-2. L'interféron  $\Omega$  recombinant félin est produit dans des larves de verre à soie à l'aide d'un Baculovirus vecteur. Une unité  $\Omega$  /kg/j est administré IV à ces chiens pendant 3 jours consécutifs à partir du quatrième jour post-inoculation et

du liquide physiologique est administrée au groupe témoins. Le groupe témoin présente toujours de forts signes cliniques après injection tandis ce que le groupe traité à l'interféron le matin présente une amélioration des signes cliniques, dont un arrêt de la diarrhée, dès le soir. L'IFN  $\Omega$  recombinant du chat permet donc une amélioration rapide des symptômes et en particulier de l'entérite causée par CPV-2.

**KUWABARA M *et al* (2006)** montre l'action de l'IFN  $\Omega$  (KT 80 recombinant du chat) chez 14 chiens sains et 13 chiens atteints naturellement de parvovirus. Une unité  $\Omega$  /kg/j est administré IV à ces chiens pendant 3 jours consécutifs. Des échantillons sanguins sont récoltés à 1 h et à 3 h après injection. Chez les chiens sains, l'activité phagocytaire des cellules sanguines est largement augmentée à 3 h ; l'activité des macrophages diminue légèrement à 1h mais est multipliée par 2 à 3 h ; l'activité des lymphocytes sanguins périphériques (PBL), et en particulier des natural killers (NK) augmente elle aussi. Les chiens CPV positifs sont classés en trois catégories en fonction de leur taux de globules blancs avant traitement. Le groupe présentant le plus fort taux de GB présente la même augmentation d'activité que les chiens sains. Deux chiens sur sept de ce groupe voient leur activité chuter après trois heures, leurs symptômes s'aggravent et ils meurent. Le taux de survie de ce groupe est de 72.5%. Dans le deuxième groupe, tous les chiens meurent sauf un et l'activité de leurs GB a tendance à diminuer une heure après l'injection. L'animal qui survie montre, lui, une augmentation de l'activité de son système immunitaire comparable à celle des chiens sains. Enfin, le troisième groupe qui a le plus faible taux de GB ne répond pas à l'injection, les chiens se dégradent et meurent tous au cours du traitement.

L'IFN  $\Omega$  exercerait donc des effets thérapeutiques non seulement par son action anti-virale mais aussi en stimulant de manière continue le système immunitaire des animaux infectés. Les animaux possédant encore plus de  $5.10^3$ GB/ $\mu$ L présentent alors une amélioration de leurs symptômes et une baisse de la létalité.

### 3. Coût

Le coût des soins d'un chien de 10 Kg dont le diagnostic de parvovirose est suspecté puis confirmé, revient à un total approximatif de 800€ comprenant :

Une consultation d'urgence à 55 €,

Une hospitalisation d'une semaine à 175€ (25€ par jour),

Des examens complémentaires de laboratoire (hémogrammes, numérations formules sanguines, bilan biochimique, pression artérielle...) à 90€,

Un test rapide à 25€,

Une analyse PCR à 50€,

Une radiographie abdominale à 50€,

Une échographie abdominale à 100€,

Une fluidothérapie à 110€,

La pose d'une sonde naso-oesophagienne à 50€,

Des médicaments pour un total approximatif de 150€.

Cette estimation ne tient pas compte des éventuelles complications pouvant engendrer un coût plus important et sans compter un traitement à l'interféron.

En effet, l'IFN  $\Omega$  est un coût conséquent dans le traitement d'une parvovirose. Par exemple, Virbagen oméga 10 MU contenant 5 flacons de 1 mL vaut 505.47€. Cela peut doubler le coût du traitement de la parvovirose : pour un chien de 10Kg, le traitement sur les trois jours consécutifs revient à 758,2 €.

#### 4. Pronostic

Un ionogramme, une biochimie et une numération formule doivent être effectuées tous les deux jours pour pouvoir suivre l'état physiologique du patient et lui administrer au plus vite les traitements nécessaires si d'autres fonctions vitales se dégradent.

Concernant les animaux contaminés, en l'absence de traitements, la mort survient en 48 à 72H suite à l'hypovolémie ou aux complications (septicémie, CIVD). Un diagnostic précoce et l'instauration d'un traitement rapide favorisent le pronostic. Passé 48H, le pronostic s'améliore jusqu'à la guérison rapide et la convalescence qui surviennent en une semaine. Les chiots rescapés présentent un retard de croissance mais les adultes ne conservent aucune séquelle.

## II. MODALITES DE PROTECTION : LA PROPHYLAXIE MEDICALE

### 1. Immunité maternelle et immunité vaccinale

Le principal problème de protection des chiots est la persistance d'anticorps maternels qui inhibent, suite à l'injection de vaccin, le développement d'une réponse immunitaire propre au chiot face au vaccin. Or, les anticorps maternels ne sont pas assez nombreux pour le protéger contre une infection virale car ils commencent à décroître : c'est la période critique (FIGURE 40).

#### *a. Immunité maternelle*

Une chienne immune transfère ses anticorps à ses chiots essentiellement via le colostrum et le placenta (TABLEAU 10). La quantité d'anticorps reçus par le chiot est directement proportionnelle au titre IHA de la mère. Le placenta de type endothéliochorial permet la transmission de seulement 5 à 10% des IgG de la mère. Le colostrum, essentiel à la survie d'un chiot, apporte donc 90% des anticorps maternels en traversant la barrière intestinale qui est perméable durant les deux premiers jours de vie.

**Tableau 10** : Mode de transfert des anticorps maternels au chiot. D'après **MORAILLON (1982)**

| anticorps des nouveaux nés         |                |   |   |
|------------------------------------|----------------|---|---|
| % du titre en anticorps de la mère |                | % du titre en anticorps du chiot obtenu par voie colostrale | % du titre en anticorps du chiot obtenu par voie transplacentaire |
| avant la tétée                     | après la tétée |   |   |
| 5,7                                | 60             | 90  | 10  |

Le titre maximal en anticorps maternels est atteint à 48h après la naissance puis la cinétique de décroissance logarithmique (FIGURE 40) est définie par l'équation suivante, **MORAILLON (1982)**

$$\text{Log}_{10}(\text{titre IHA chiot}/\text{titre IHA mère})=ax+b$$

Avec  $a = \text{pente} = -0,034$

$b = \text{pourcentage théorique de transmission des anticorps maternels} = -0,4$

$x = \text{âge du chiot en jour}$ .

La demi-vie des anticorps maternels anti-parvovirus est donc de 8 à 10 jours. La fin de la protection maternelle survient principalement entre la 6<sup>e</sup> et la 10<sup>e</sup> semaine de vie. En effet, les chiots nés de mères avec un titre en anticorps faible seront sensibles à l'infection dès la 6<sup>e</sup> semaine contre la 12<sup>e</sup> semaine pour les chiots nés de mère avec un titre fort.

### *b. L'immunité vaccinale*

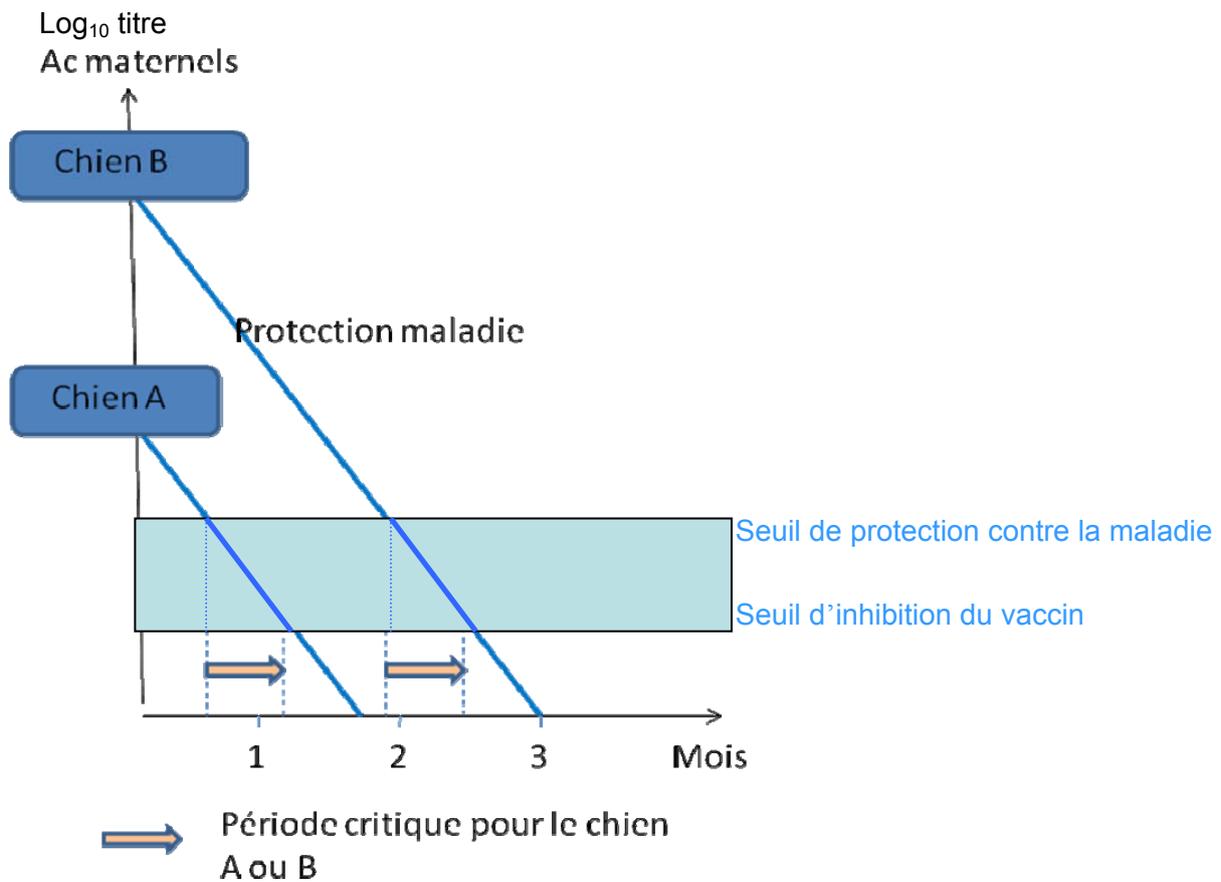
L'immunité vaccinale ne peut donc se mettre en place que si la concentration des anticorps maternels anti parvovirus vaccinal est en dessous d'un seuil spécifique d'interférence. Le titre en anticorps juste inférieur à ce seuil correspond au moment optimal pour la vaccination. Ainsi, l'écart entre le seuil de protection et le seuil d'interférence est la Période Critique. (FIGURE 40).

Il semble que le titre en anticorps maternels seuil, mesuré par IHA, interférant avec l'immunité vaccinale soit de 1/20<sup>e</sup>. Cependant, une faible quantité d'anticorps maternels résiduels (titre IHA < 10) est capable d'interférer avec la vaccination et peut être inférieure au seuil de détection IHA.

La vaccination échoue alors. Les chiots sont protégés contre l'infection à partir d'un titre en anticorps maternels IHA de 1/80<sup>e</sup>. Donc entre ces deux titres seuil, les chiots ne sont ni protégés par les anticorps maternels ni par la réponse vaccinale. C'est souvent au cours de cette période, entre 2 et 5 semaines, que les chiots sont contaminés et déclenchent une parvovirose fatale. **WANER T et al. (1996).**

Un titre en anticorps inhibant l'hémagglutination supérieur ou égal à 80 est donc considéré comme protecteur. Des titres compris entre 10 et 80 IHA empêchent le développement de la maladie mais pas l'infection et un titre IHA inférieur à 10 entraîne une parvovirose clinique.

**Figure 40** : La période critique en fonction du temps. D'après **Polycopié de Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (2006/2007)**



On constate que la période critique varie d'un chiot à l'autre. En effet, sur la FIGURE 40, le chien A aura une vaccination efficace dès 1,5 mois alors que le chien B sera protégé par le vaccin seulement à 2,5 mois. La plupart du temps, les chiots nés de mères séronégatives répondent correctement à la vaccination entre un et deux mois. Par contre, les chiots possédant une immunité passive résiduelle au moment de la vaccination ne s'immunisent pas, quelque soit le type de vaccin. La réponse à la vaccination n'est possible que 2 à 4 semaines après la séronégativité du test IHA, soit à l'âge de 3 mois.

Ainsi, on conseille de vacciner les chiots dès 6 semaines puis à 10 semaines et enfin à 14 semaines.

Une étude menée par **WANER T et al. (1996)** mesure le titre en anticorps dirigés contre le parvovirus canin chez 10 mères et 40 chiots afin de mettre en place un test rapide pour évaluer si les animaux sont protégés contre le virus. Ce test serait utile durant la phase critique, entre 6 et 16 semaines, phase durant laquelle la protection vaccinale est aléatoire. Les mères sont vaccinées avec un vaccin vivant modifié atténué entre le 30<sup>e</sup> et le 40<sup>e</sup> jour de gestation. Les chiots sont vaccinés avec le même vaccin à 6 et 9 semaines. Le titrage en anticorps des mères est réalisé par test ELISA

et par IHA sur du sang prélevé à 55 jours de gestation. Les mêmes techniques sont utilisées sur le sang des chiots prélevé le 1<sup>er</sup> jour puis aux semaines 2, 4, 6, 9, 12, 16 et 18. Le test ELISA est réalisé sur un support Coombs où est présent l'antigène CPV-2. Le sang est dilué à 1/20<sup>e</sup>, disposé dans les cupules, incubé pendant 5 minutes et après deux lavages, les anticorps fixés sont révélés par un ligand. Toutes les mères vaccinées présentent un titre en anticorps protecteur et les chiots reçoivent cette immunité. On constate que les anticorps maternels décroissent de manière exponentielle chez les chiots. 47% des chiots vaccinés à la 6<sup>e</sup> semaine ont une immunité vaccinale suffisante (supérieure à 1/40<sup>e</sup>), 97% sont protégés après le vaccin à 9 semaines et enfin 100% des chiots sont protégés à 20 semaines. La vaccination fonctionne chez 39% des chiots ayant un titre en anticorps maternels de 1/10<sup>e</sup> alors que 5% des chiots ayant un titre en anticorps maternels de 1/80<sup>e</sup> sont protégés. La technique du kit ELISA offre l'opportunité de réaliser un protocole vaccinal adapté en fonction de l'immunité du chiot. Cependant, cette technique est moins sensible que l'hémagglutination qui demande des manipulations de laboratoire poussées.

Les échecs de vaccination face au parvovirus peuvent donc être expliqués de différentes manières :

- D'une part, les chiots peuvent être infectés par le virus durant la période critique, avant que l'immunité vaccinale soit effective et après que les anticorps maternels aient disparu.
- Un défaut dans la vaccination des mères peut aussi être à l'origine d'infections des chiots qui n'ont alors pas l'immunité maternelle.

En conclusion, La réceptivité du chiot au parvovirus est d'autant plus précoce que la mère possède au moment de la mise bas un titre en anticorps faible, que l'ingestion de colostrum par le chiot est restreinte ou tardive, que l'exposition au parvovirus est fréquente, que le chiot reçoit des injections vaccinales trop précoces.

## 2. Les Vaccins

Un animal infecté et survivant à la maladie développe une immunité acquise solide qui le protégera à vie contre le parvovirus. Cette immunité se traduit par une protection vis-à-vis de l'épreuve virale avec absence d'excrétion dans les selles. De manière similaire, la vaccination entraîne le développement d'une immunité protectrice et semble donc être une bonne méthode de prévention.

Pour avoir un vaccin performant, plusieurs paramètres sont à prendre en compte car ils peuvent influencer la réponse vaccinale : le titre en virus vaccinal, le degré d'atténuation virale, le mode d'administration, la capacité antigénique de la souche.

*a. Vaccins hétérologues à base de FPV*

Historiquement, on utilisait les vaccins contre la panleucopénie féline inactivés au formol ou atténués pour protéger les chiens contre le parvovirus canin. Le protocole consistait en deux injections à 15 jours d'intervalle. Une lymphopénie pouvait être provoquée par cette vaccination.

*i. Vaccin inactivé*

Des études récentes menées par **IKEDA Y et al. (2002)** ont montré que les vaccins à base de souche FPV inactivée protègent les chiens et les chats contre les souches de CPV-2a/2b quinze jours après l'injection. Une étude sur la neutralisation croisée des anticorps induits par ces souches de FPV inactivées sur des chats vaccinés montre que des anticorps contre CPV-2a, 2b et 2c sont produits mais en quantité trop faible pour assurer une protection contre ces souches. Ainsi, les vaccins inactivés sont peu efficaces contre CPV-2 et peuvent engendrer des infections sub-cliniques à l'origine d'excrétion virale dans les selles, source de contamination pour les autres animaux.

Cependant, les chats sont aujourd'hui encore parfois vaccinés avec des souches de FPV inactivées même si l'efficacité contre CPV-2a/2b est faible car ces dernières sont peu pathogènes dans cette espèce. Les vaccins à base de FPV ont été conservés car ce sont les seuls à protéger contre la Panleucopénie féline. En effet, les vaccins à base de CPV-2a ou 2b ne protègent pas contre le typhus. Cependant, l'arrivée de CPV-2c pathogène chez le chat pose un problème. Ainsi, un vaccin à base de CPV-2c chez le chat pourrait peut être permettre une protection contre FPV et les souches de CPV-2.

*ii. Vaccin vivant atténué*

Des vaccins vivants atténués à base de FPV sont aujourd'hui majoritairement utilisés. L'efficacité est fonction de la dose injectée :  $10^{5,7}$  DCIT<sub>50</sub>/dose permet d'obtenir une immunité chez 43% des chiens d'après **POLLOCK R et COYNE M (1993)**. Des titres en anticorps élevés se développeraient uniquement lorsque le vaccin se réplique. Or, la réplication vaccinale est limitée

comparée à celle qui survient lors d'une infection naturelle. L'échec de la vaccination avec un vaccin FPV atténué s'explique par la persistance des anticorps maternels chez le chiot et par une protection croisée suffisante contre les souches CPV-2a, 2b et 2c. Les chiens vaccinés avec des souches de FPV atténuées ne représentent pas une source d'infection car la quantité excrétée dans les selles est minime.

L'inconvénient majeur avec ce type de vaccin est la quantité nécessaire pour induire une immunité qui est égale à 1000 fois la dose nécessaire avec un vaccin à base de CPV.

#### *b. Vaccins homologues à base de CPV-2*

Aujourd'hui, la plupart des vaccins utilisés dans le monde sont des vaccins homologues à base de cultures d'une des souches de parvovirus canin.

##### *i. Vaccin inactivé*

Des vaccins contenant la première souche découverte, CPV-2, inactivée ont été étudiés mais la cinétique de mise en place des anticorps est longue et le taux d'anticorps décline rapidement après 3 semaines. Avec l'utilisation du CPV-2 inerte, il faudrait plusieurs injections même après 12 semaines d'âge. Ainsi, la durée de l'immunité obtenue avec ce type de vaccin est bien inférieure à celle obtenue avec des vaccins homologues atténués.

##### *ii. Vaccin vivant atténué conventionnel*

Des vaccins à base de CPV-2 canin isolé ont été créés par James Baker Institute for Animal Research, New York State College of Veterinary.

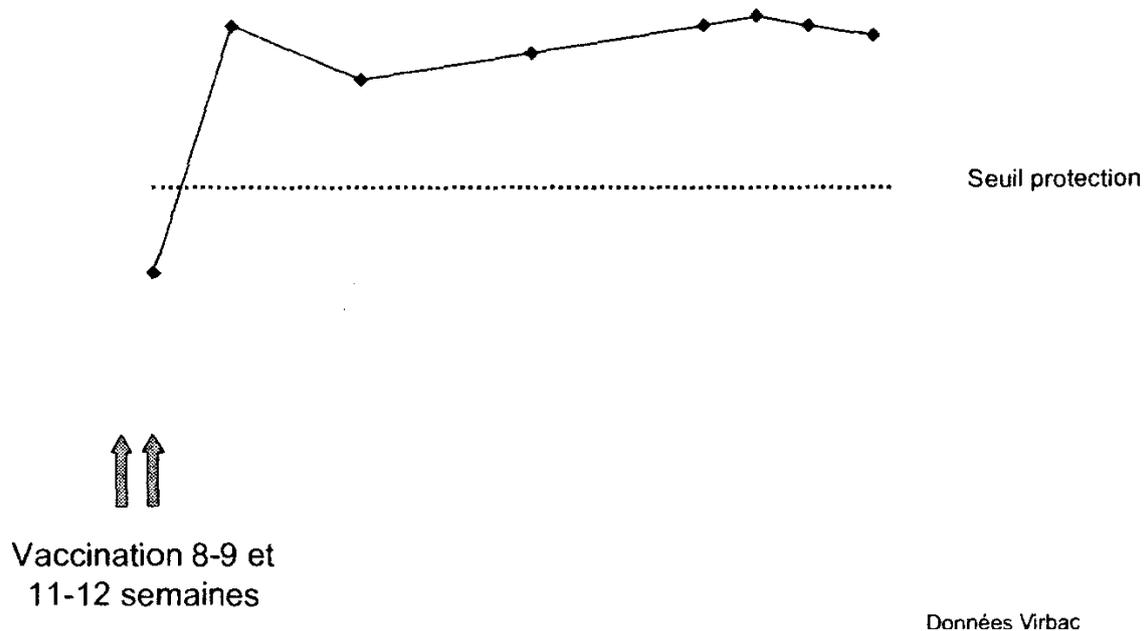
#### **A. Particularités**

**CARMICHAEL *et al.* (1994)** ont montré dans une étude que tous les chiots vaccinés avec un titre en virus vaccinal supérieur ou égal à  $10^{1,2}$  DCIT<sub>50</sub>/mL ont développé des titres IHA protecteurs. En pratique, les vaccins contiennent  $10^{3,2}$  à  $10^{5,2}$  DCIT<sub>50</sub>/ dose. Le titre en anticorps neutralisant est maximal 14 jours après la vaccination et protège dès 7 jours post vaccination. (FIGURE 41).

L'efficacité du vaccin est grande chez les animaux séronégatifs mais elle diminue proportionnellement au taux d'anticorps pré-vaccinal. La durée de l'immunité est de 12 à 24 mois. L'innocuité est grande car des chiens vaccinés avec une dose 50 fois supérieure n'ont pas présenté de signe clinique.

**Figure 41** : Cinétique des anticorps neutralisants après vaccination avec une souche CPV-2. D'après **Polycopié de Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, (2006/2007)**

**Cinétique des anticorps neutralisants après vaccination (n = 30)**



**B. Protocole vaccinal**

Ce vaccin vivant atténué à base de souches de CPV-2 est actuellement administré à 6 ou 8 semaines puis toutes les 3 ou 4 semaines jusqu'à l'âge de 12 semaines. Pour les animaux âgés de plus de 16 semaines, une seule injection est pratiquée. Un rappel est conseillé un an plus tard puis tous les deux ans (trois ans peuvent être suffisants). Il semble même que des études aient démontré l'efficacité du vaccin à base de CPV-2 pendant 9 ans sans rappel chez les chiens vaccinés correctement dès leur jeune âge. **SCHULTZ R et al (2009)**. (TABLEAU 14). Un test sérologique pourrait donc permettre de diminuer le nombre de chiens à revacciner. Les vaccins à base de CPV-2

sont actifs contre les souches 2a, 2b et 2c mais n'engendreraient pas toujours une immunité suffisante face aux souches actuelles.

**SCHULTZ R et al (2009)** montre que des vieux chiens vaccinés dès leur jeune âge ont une immunité suffisante pour les protéger même si il est vrai que la réponse immunitaire s'affaiblit chez les animaux âgés. Par contre, un jeune adulte, mal vacciné à ses débuts, peut mourir d'une maladie virale contre laquelle il est sensé être protégé. Ainsi, il est important de suivre rigoureusement le protocole de primo-vaccination. Seulement 50% des chiens et 25% des chats sont correctement vaccinés aux Etats-Unis.

Un exemple de vaccin largement utilisé est NOVIBAC CHPPiL ND (INTERVET) qui protège contre le parvovirus en inoculant la souche atténuée de CPV-2 154, mais aussi contre la leptospirose, la maladie de Carré, le parainfluenza et l'hépatite de Rubarth. En effet, le vaccin CPV modifié peut être utilisé en même temps que d'autres valences comme *Leptospira canicola* et *L. icterohaemorrhagiae*, *Parainfluenza*, Maladie de Carré et Hépatite de Rubarth.

(Vaccins vivants atténués commercialisés en France et fabriqués à partir d'une souche CPV-2 : PARVODOG ND, PARVIGEN ND, DOHYVAC ND, PRIMODOG ND, ENDURACELL PARVO ND, VANGUARD CPV ND, NOVIBAC PARVO-2 ND)

Les protocoles vaccinaux sont réévalués régulièrement aux Etats-Unis et la nouvelle version est publiée à l'intention des vétérinaires. Le protocole pour la parvovirose a été modifié en 2006. (TABLEAU 11)

**Tableau 11:** Mise à jour du protocole vaccinal aux Etats-Unis. D'après **AAHA Canine Guidelines' for the General Veterinary Practice (2006)**

| Table 1<br>2006 AAHA Canine Vaccination Guidelines <sup>1</sup> for the General Veterinary Practice |  |   |  |  |
|---|--|---|--|--|
| Vaccine <sup>†</sup>  | Initial Puppy Vaccination <sup>‡</sup><br>(≤16 weeks)                          | Initial Adult Vaccination<br>(>16 weeks)                                      | Revaccination<br>(Booster) Recommendation  | Comments and Recommendations<br><i>See the second page of the guidelines for definitions of core, noncore, and nonrecommended vaccines</i>   |
| Canine Parvovirus (CPV-2) (MLV)   | Administer at 6-8 weeks of age, then every 3-4 weeks until 12-14 weeks of age. | Two doses, 3-4 weeks apart. One dose is considered protective and acceptable. | After a booster at 1 year (unless manufacturer label recommends otherwise), revaccination once every 3 years or more is considered protective. | <i>Core:</i> Although annual boosters are recommended by some vaccine manufacturers, studies have shown protection against challenge (DOI) up to 7 years postvaccination with MLV vaccine. <sup>5,†</sup> Products with CPV-2, regardless of genotype (i.e., CPV-2, 2a, or 2b), all provide excellent protection against field isolates. |
| Canine Parvovirus (CPV-2) (killed)  |  |   |  | <i>Not Recommended:</i> Killed parvovirus products have been shown to be susceptible to maternal antibody interference in puppies as old as 16-18 weeks. Multiple doses (2-5) may be required even in puppies older than 12 weeks. <sup>1</sup>  |

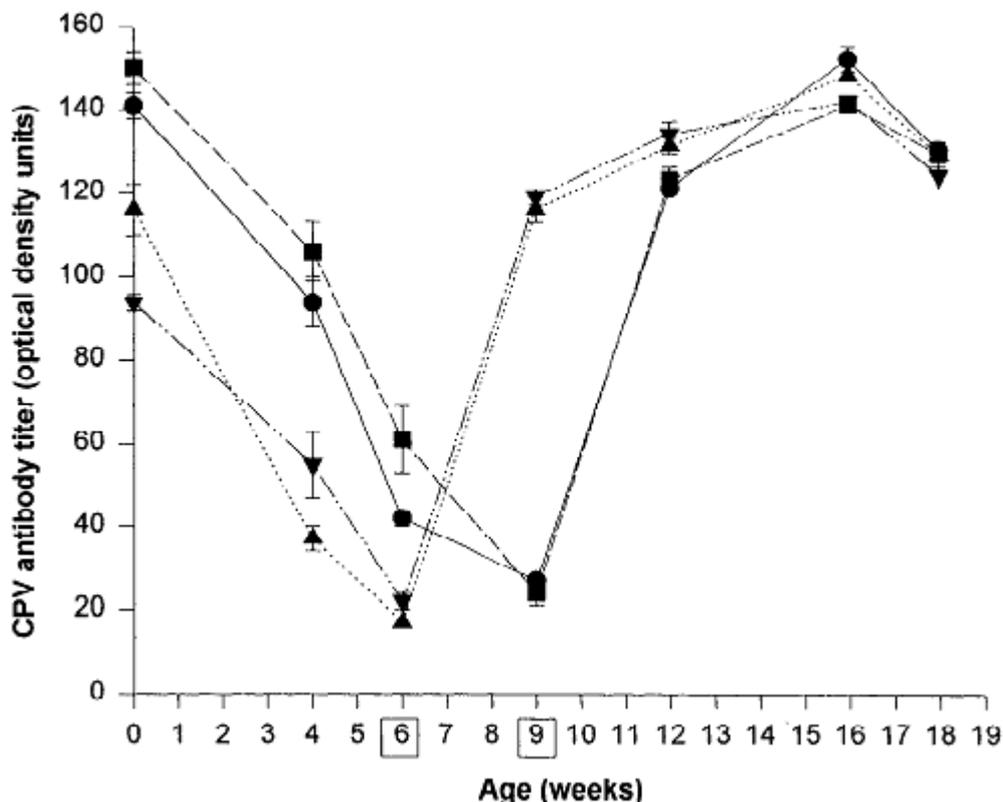
### C. Inconvénients

Ce type de vaccin peut engendrer une excrétion fécale potentiellement infectieuse. Des études ont montré que les chiens vaccinés avec un vaccin atténué sur passage sur cellules A72 présentent une excrétion du virus entre le 4<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour post vaccination suffisante pour infecter des chiens mis en contact.

### D. Avantages

La quantité d'anticorps maternels interférant avec la vaccination dépend du type de vaccin. En effet, la période critique est plus longue avec un vaccin inactivé : 4 semaines contre 2 semaines avec un vaccin atténué. A l'heure actuelle, aucun vaccin n'est capable d'immuniser un chiot durant la période critique. **CARMICHAEL *et al* (1994)** met en évidence l'efficacité aléatoire du vaccin pendant la période critique chez quatre portées de chiots. (FIGURE 42). En effet, on constate que deux portées (▲ et ▼) ont une réponse immunitaire satisfaisante après la première injection, soit à 6 semaines, tandis ce que les deux autres portées (● et ■) ont une réponse immunitaire seulement après la seconde injection à 9 semaines.

**Figure 42** : Réponse vaccinale de quatre portées de chiots vaccinés avec Novibac DP, à 6 et 9 semaines. D'après **CARMICHAEL *et al* (1994)**



Il existe cependant des études sur les vaccins atténués à haut titre afin de contrecarrer la période critique.

#### E. Innocuité

- La mise en cause du vaccin à l'origine de la contamination a été exclue à de nombreuses reprises. Par exemple, **DOKI M *et al.* en 2006** isole à partir de prélèvements fécaux 7 souches de parvovirus de chiots infectés entre 60 et 90 jours. Après séquençage du génome de VP2 des 7 souches, on constate que la souche CPV-2 utilisée pour le vaccin est très différente des souches retrouvées chez les chiots et ne peut donc être la cause de l'infection.

#### iii. Vaccin atténué haut titre

Il a été créé d'après l'hypothèse selon laquelle la capacité à surpasser les anticorps maternels dépend du titre infectieux du vaccin, un vaccin atténué à haut titre. Une étude menée par **BURTONBOY S *et al.* (1991)** montre que le taux de séroconversion est plus élevé avec un vaccin à plus haut titre chez des chiots de 4 à 11 semaines (100% avec un vaccin titré à  $10^{7,6}$  DCIT<sub>50</sub> contre 92% avec un titre à  $10^{7,0}$  DCIT<sub>50</sub>). L'animal de 11 semaines est immunisé au bout de 7 à 14 jours après la vaccination malgré la présence d'anticorps maternels. Ainsi, 44% des chiots ayant un titre IHA > 32 présentent une séroconversion lors d'une vaccination à haut titre. Le taux de séroconversion est de 84% chez des chiots vaccinés à 8 semaines puis à 12 semaines malgré un titre en anticorps maternels élevé. De plus, l'immunité induite par ces vaccins à haut titre semble durer plusieurs années mais un rappel annuel est conseillé. L'excrétion fécale observée lors de vaccination atténué à haut titre reste faible.

Les vaccins à haut titre sont donc plus efficaces que les vaccins atténués conventionnels et ont permis de diminuer la période critique de 20 jours (car on augmente de 2 dilutions les titres IHA des anticorps maternels soit 32 et 64 contre < à 10 et 20 pour les conventionnels). Elle se situe donc

entre le 40<sup>ème</sup> et le 50<sup>ème</sup> jour pour les vaccins atténués à haut titre (contre 40<sup>ème</sup> au 70<sup>ème</sup> jour pour les conventionnels).

VANGUARD ND (PFIZER) est un exemple de vaccin vivant atténué haut titre aujourd'hui encore utilisé en clientèle pour son efficacité et son immunité longue durée.

Cependant, actuellement, il serait aussi intéressant d'utiliser des vaccins à base des nouvelles souches CPV-2a et 2b qui ont maintenant remplacé CPV-2.

*c. Vaccins incluant les nouvelles souches CPV-2a/CPV-2b*

Il était admis que la vaccination contre l'une des souches de parvovirus induisait une immunité croisée contre les deux autres souches mais des études ont montré que la protection induite n'est pas équivalente pour toutes les souches. De nouveaux types de vaccins vivants modifiés homologues à base de CPV-2a et 2b ont alors été étudiés.

i. Le vaccin composé des souches CPV-2 (Cornell 780916) et CPV-2a :

Ces souches sont atténuées, elles se répliquent mais ne provoquent pas d'infection. Il existe aujourd'hui peu de vaccin à base de CPV-2a même si elle reste la souche la plus fréquente en Europe.

ii. Le vaccin composé des souches CPV-2 (Cornell 780916) et CPV-2b :

A. Particularités

Pour fabriquer ces vaccins, des souches virales de CPV-2b sont atténuées par 68 passages sur des cellules de reins de chats jusqu'à ce qu'un titre de cellules de  $10^{4,5}$  DCI<sub>50</sub>/mL. **MARTELLA V et al. (2005)**. Les vaccins à base de CPV-2b sont largement utilisés aux Etats-Unis et commencent à être utilisés en Europe. Ils ont aujourd'hui une AMM dans plusieurs pays européens et leur extension est recommandée.

**PRATELLI A. et al. en 2001** révèle les différences significatives entre les titres en anticorps, mesurés par séroneutralisation, chez des chiots vaccinés avec un vaccin vivant atténué à base de CPV-2 ou avec un vaccin vivant modifié CPV-2b. Les titres en anticorps chez les chiots vaccinés par CPV-2 sont 30 fois plus élevés contre la souche virale CPV-2 que contre les souches virales CPV-2a et 2b (TABLEAU 12 A) alors que les chiots vaccinés avec le vaccin contenant CPV-2b présentent des titres en anticorps élevés face à toutes les souches de parvovirus canin. (TABLEAU 12 B) De plus, l'immunité après les deux injections à trois semaines d'intervalle est plus longue avec le vaccin CPV-2b.

**Tableau 12:** Résultats des tests de séroneutralisation face à CPV-2 et CPV-2b chez des chiots vaccinés avec des vaccins vivants modifiés CPV-2 (*figure A*) et CPV-2b (*figure B*). D'après **PRATELLI et al (2001)**

| Pup no. | Antibody titer |       |
|---------|----------------|-------|
|         | CPV2           | CPV2b |
| 1       | 320            | <10   |
| 2       | 10,240         | 160   |
| 3       | 2,560          | 160   |
| 4       | 2,560          | 160   |
| 5       | 20,480         | 160   |
| 6       | 10,240         | 320   |
| 7       | 2,560          | 320   |
| 8       | 1,280          | 640   |
| 9       | 20,480         | 1,280 |
| 10      | 5,120          | 160   |
| 11      | 10,240         | 320   |
| 12      | 5,120          | 160   |
| 13      | 2,560          | 40    |
| 14      | 5,120          | 160   |
| 15      | 2,560          | 40    |
| 16      | 10,240         | 320   |
| 17      | 10,240         | 160   |
| 18      | 5,120          | 320   |
| Mean    | 4,732          | 162   |

*Figure A*

| Pup no. | Antibody titer |       |
|---------|----------------|-------|
|         | CPV2           | CPV2b |
| 19      | 1,280          | 640   |
| 20      | 640            | 640   |
| 21      | 640            | 640   |
| 22      | 1,280          | 1,280 |
| 23      | 1,280          | 640   |
| 24      | 5,120          | 2,560 |
| 25      | 640            | 2,560 |
| 26      | 1,280          | 1,280 |
| 27      | 2,560          | 640   |
| 28      | 2,560          | 640   |
| 29      | 640            | 1,280 |
| 30      | 640            | 1,280 |
| 31      | 640            | 1,280 |
| 32      | 640            | 1,280 |
| 33      | 640            | 2,560 |
| 34      | 320            | 1,280 |
| 35      | 640            | 1,280 |
| 36      | 640            | 1,280 |
| Mean    | 940            | 1,138 |

Figure B

**OHSIMA T *et al* en 2008** arrivent aux même conclusions : les vaccins à base des nouvelles souches CPV-2b sont beaucoup plus efficaces actuellement que ceux à base de CPV-2. L'étude est basée sur le sérum de chiots sains de 8 semaines, jamais vaccinés et donc séronégatifs. On les vaccine deux fois à trois semaines d'intervalle avec un vaccin vivant modifié à base de CPV-2 pour un groupe et à base de CPV-2b pour un autre. Une prise de sang est réalisée trois semaines après la première injection et des dilutions sont réalisées pour titrer les anticorps par inhibition de l'hémagglutination. Les résultats montrent que les anticorps obtenus après la première vaccination sont beaucoup plus efficaces pour le vaccin à base de CPV-2b. Cependant, les anticorps obtenus après la seconde injection sont identiques pour les deux souches vaccinales.

Le vaccin à base de CPV-2b apporte donc une protection plus précoce aux chiots et protège de manière correcte contre les trois souches de parvovirus. De plus, les souches CPV-2a et 2b ayant aujourd'hui remplacé le CPV-2, il semble maintenant essentiel d'induire une protection correcte contre ces deux souches.

## B. Protocole vaccinal

Le protocole vaccinal est le même que celui appliqué pour les vaccins vivants homologues atténués à base de CPV-2. C'est la valence parvovirose qui peut être associée à l'adénovirus canin de type 2, au virus de la Maladie de Carré, à la Leptospirose et à la rage. On peut commencer à vacciner à l'âge de 6 semaines et pendant toute la vie de l'animal, même durant la gestation. Les anticorps protègent dès 5 à 6 jours après la vaccination.

Quelques effets secondaires sans conséquence comme un prurit ou une inflammation au site d'injection ont été décrits. Des réactions d'hypersensibilité peuvent être observées occasionnellement. Les vaccins vivants modifiés à base de CPV-2b mis sur le marché en France sont CANIGEN PUPPY 2B ND (Virbac 2004) et DURAMUNE MAX 5 ND (Fort Dodge 2008).

## C. Innocuité

Une étude menée par **DECARO N *et al.* (2007 c)** a montré l'innocuité du vaccin. En effet, durant la semaine suivant la première injection vaccinale, des chiots présentant des symptômes proches de ceux de la parvovirose comme de la diarrhée et de l'anorexie. L'étude tente alors de différencier les souches de CPV vaccinales ou sauvages présentes dans les selles de ces animaux. Pour ce faire, des applications MGB sont utilisées. Les souches retrouvées chez les chiens vaccinés à base de CPV-2b atténué sont à 60% CPV-2a, 20% CVPV-2c et les 20% restants présentent des symptômes dus à des infections parasitaires ou bactériennes. Cette étude confirme que dans la plupart des cas de maladie suivant la vaccination, l'infection est due à des souches externes de parvovirus et non à une réversibilité de la virulence du virus modifié contenu dans le vaccin. La première injection de vaccination se faisant durant la période critique, le parvovirus se déclare souvent chez les chiots autour de cette période.

### *d. Vaccins peptidiques*

Des peptides courts sont synthétisés chimiquement à partir de l'extrémité N-terminale de la protéine VP2. Ils sont couplés à des protéines transporteurs et injectés chez l'hôte pour produire une réponse immunitaire. Ils présentent une sécurité d'emploi et interfèrent peu avec les anticorps maternels. De plus, la distinction entre les animaux vaccinés et infectés est aisée mais leur élaboration reste

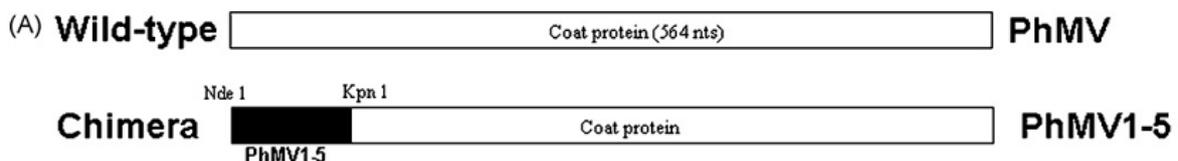
difficile et nécessite l'ajout d'un adjuvant de l'immunité. Ils ne sont pas utilisables actuellement.

## CASAL JI (1995)

### *e. Vaccins recombinants*

- Le gène codant pour la protéine VP2 est inséré dans le génome d'un vecteur vivant, un baculovirus, qui exprime alors l'antigène étranger dans l'organisme vacciné. Ces vaccins sont plus efficaces que les vaccins inactivés mais moins que les souches atténuées. Ils ne sont pas utilisés actuellement. **TURISO *et al.* (1992)**
- **CHANDRAN D *et al* (2009)** étudie la possibilité de développer des vaccins inactivés plus efficaces. Pour cela, des vaccins recombinants sont générés à base de virus de plantes dont les structures sont définies. Par exemple le Physalis Mottle Tymovirus (PhMV) est un virus sphérique à ARN double brin qui est connu pour son extrémité N-terminale très flexible et sa capacité à s'assembler dans les capsides d' *E.coli*. Une chimère TVLP est donc formée et clonée dans une *E.Coli* à partir de ce virus dont la partie N-terminale est substituée par des épitopes neutralisants de parvovirus canin (sites antigéniques 1 à 7 situés sur VP2) et de Maladie de Carré (épitope T-cell). (FIGURE 43).

**Figure 43:** Représentation schématique des chimères : insertion d' épitopes à l'extrémité 5' dans la structure protéique de PhMV. D'après **CHANDRAN D *et al* (2009)**

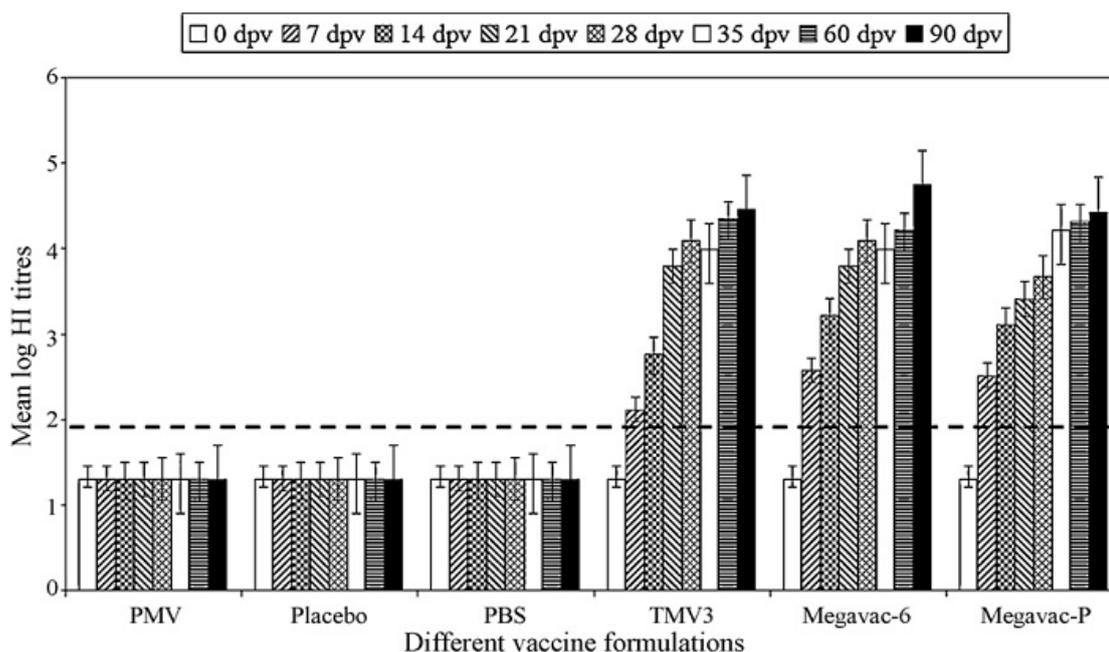


Différentes combinaisons de ce vaccin sont ensuite testées chez des porcs et chez des chiens. Il apparaît alors que la combinaison PhMV3, contenant les sites antigéniques 1-2,4 et 6-7 de CPV ainsi que l'épitope p35 de CDV, active la meilleure réponse immunitaire, aussi efficace que celle engendrée par les vaccins vivants atténués actuellement utilisés. (FIGURE 44). De plus,

PhMV3 est actif en présence d'anticorps maternels et pourrait donc être une solution pour vacciner au cours de la période critique.

Cette étude met donc en évidence la possibilité d'utilisation de vaccins chimériques TVLP pour induire une immunité efficace contre le parvovirus canin et la maladie de Carré.

**Figure 44:** Comparaison du pouvoir immunogène de différentes formules vaccinales face à CPV-2 mesuré par inhibition de l'hémagglutination. D'après **CHANDRAN D et al (2009)**



dpv = day post vaccination

Megavac 6 et Megavac P sont deux noms déposés de vaccins vivants modifiés à base de CPV-2.

#### f. Vaccins ADN

Un plasmide bactérien non répliquant portant le gène codant pour VP1 et VP2 est injecté dans l'hôte et exprime le gène vaccinant dans le noyau des cellules. Deux injections à deux semaines d'intervalle sont nécessaires pour déclencher une réponse immunitaire suffisante. L'efficacité à long terme n'est pas connue et il existe un risque que le plasmide interagisse avec le génome de l'hôte. L'efficacité du vaccin ne semble pas être affectée par la présence d'anticorps maternels et la production du vaccin est facile mais il n'est pas encore commercialisé.

g. *Vaccins par voie intra-nasale et orale*

➤ Des études ont été menées pour tenter d'enrayer l'obstacle à une vaccination efficace posé par les anticorps maternels lors de la période critique. L'association d'un vaccin parentéral et intra-nasal est alors envisagée. Il suffit d'un faible titre en CPV-2b pour déclencher une immunité rémanente par voie parentérale donc un vaccin intra-nasal à base de CPV-2b peut-être envisagée. En effet, par voie intra-nasal, seulement un faible titre viral est administré. Une expérience menée par **MARTELLA V et al. en 2005** sur des chiots immunisés avec un vaccin vivant modifié à base de CPV-2b par une injection intra-nasale à 5 semaines puis à 7 semaines ont donné des réponses sérologiques positives deux semaines post-vaccination. L'administration intra-nasale de CPV-2b atténué s'est révélée aussi efficace que la parentérale en terme de titre en anticorps développés. Il semble, suite à cette étude que les vaccins par voie intra-nasale à base de souche CPV-2b déclenchent une protection égale à celle engendrée par les vaccins parentéraux à base de CPV-2b malgré une atténuation sur culture cellulaire supérieure. Cette étude montre encore l'intérêt des vaccins vivants modifiés à base de CPV-2b.

➤ **CHEBOLU S et DANIEL H (2009)** mettent pour la première fois en évidence la possibilité d'un vaccin vétérinaire oral à base de chloroplastes transgéniques dans lesquels sont exprimés les antigènes viraux. La mise en place d'une immunité suite à une administration orale serait permise par l'hyperexpression des antigènes vaccinaux du parvovirus dans des chloroplastes de feuilles transgéniques ou dans des plastides de carottes ou de tomates qui ont la capacité de sélectionner certain marqueurs génétiques. Il y a de nombreux avantages dans la production de protéines recombinantes chez les plantes et elles ne sont jamais l'hôte d'agents infectieux pour le chien ou l'homme.

Le peptide synthétique 2L21, qui confère une protection contre le parvovirus canin, est exprimé dans les chloroplastes de tabac avec une protéine fluorescente et une protéine de la toxine B du choléra. Le peptide 2L21 doit correspondre à 31% des protéines totales de la préparation. L'âge de la plante utilisée entre aussi en compte pour la proportion de protéines. Des tests sur des souris ont déjà montré une immunité efficace contre le parvovirus suite à l'administration intrapéritonéale d'extraits de feuilles avec 2L21. Des études sur l'efficacité de l'administration orale sont en cours.

La limite de ces vaccins reste le coût de fabrication.

### 3. Prophylaxie médicale des carnivores sauvages

Cependant, l'utilisation de vaccins inactivés est recommandée par sécurité pour les espèces sauvages. Ces vaccins ont l'autorisation d'être utilisés uniquement chez les espèces chez qui ils ont été testés. En Afrique du sud, certains félidés sauvages élevés en captivité et relâchés ont été vaccinés par des souches inactivées de FPV. En Suisse, dans certains zoos, les loups et les félidés sont vaccinés avec des souches de CPV-2 inactivé. Le virus est endémique dans de nombreuses populations d'animaux sauvages. La vaccination à base de souches inactivées de FPV ou de CPV-2 est donc fortement conseillée et de plus en plus pratiquée dans les zoos et chez les animaux qui doivent être relâchés. Cependant, **SASSA Y et al. en 2006**, montrent au cours d'une étude chez les carnivores sauvages comme le lion, l'ocelot, le lynx, le guépard et le tigre de Sibérie, qu'il n'y a pas de séroneutralisation croisée entre FPV et CPV donc le vaccin à base de FPV inactivé ne protège pas ces animaux contre le parvovirus canin. Ainsi, quatre guépards pourtant vaccinés sont morts suite à une infection par CPV-2a. Cette étude apporte des informations inquiétantes car ces félidés sauvages, sensibles à CPV-2c développent un titre en anticorps très faible contre cette souche virale et sont donc peu immunisés. Dans les zoos, les animaux sauvages sont toujours vaccinés avec des souches inactivées car les souches atténuées engendrent des symptômes. Cependant, une prophylaxie sanitaire optimale est préférable et la vaccination est utilisée en dernier recours, lors de l'émergence de la maladie dans le voisinage. La vaccination des félins sauvages des zoos a récemment commencé avec des vaccins inactivés CPV-2 mais cela ne semble pas très efficace contre les dernières souches de CPV.

### 4. Nécessité d'un nouveau vaccin pour le type 2c?

#### *a. Un nouveau vaccin semble nécessaire*

Des études menées sur de jeunes chiots atteints de CPV-2c ont mis en évidence un échec de la protection induite par les anticorps maternels **DECARO et al. (2006 d)**. En effet, des chiots de 40 jours, nés de mère vaccinée devraient être protégés contre le parvovirus. De plus, des chiens

présentant des titrages en anticorps maternels supérieur à 1/80 sont normalement considérés comme protégés contre le parvovirus. Hors certains de ces chiots avaient un titre en anticorps maternels mesuré par IHA supérieur à 1/160, donc conventionnellement considérés comme largement au dessus du seuil de protection, et présentaient tout de même une infection symptomatique par le parvovirus. Ces chiots auraient donc du être protégés. Deux hypothèses se posent alors : le taux minimal d'anticorps maternels requis est supérieur pour protéger contre CPV-2c ou le vaccin actuellement utilisé, avec lequel les mères ont été vaccinées, n'est pas efficace pour protéger contre cette nouvelle souche de parvovirus.

En Amérique du sud, plus particulièrement en Uruguay, où le type CPV-2c a déjà remplacé en grande partie les autres sous-types, d'après une étude menée par **PEREZ R *et al* en 2007**, tous les animaux infectés par le parvovirus et présentant des symptômes graves étaient vaccinés. De même, **CALDERON MG *et al.* (2009)** mettent en évidence la fréquence alarmante, depuis 2007, des chiens domestiques vaccinés qui déclarent une parvovirose, le plus souvent d'origine 2c en Argentine. Sur 38 échantillons fécaux, 14 ont révélé par PCR la présence de CPV-2c dont 11 provenaient d'animaux vaccinés avec CPV-2 (TABLEAU 13). Cependant, parmi les 11 animaux vaccinés, 9 étaient âgés seulement de deux mois et n'ont donc pas bénéficié des deux primo-injections. Les deux autres animaux adultes et correctement vaccinés avec CPV-2 prouvent que la vaccination contre CPV-2c est insuffisante.

**Tableau 13** : Observations cliniques et historique vaccinal chez des chiens infectés par le parvovirus. D'après **CALDERON MG *et al.* (2009)**

| Strain | Year | Age (month) | Sex | Breed | Vaccination status | Clinical signs | CPV strain | Procedence    |
|--------|------|-------------|-----|-------|--------------------|----------------|------------|---------------|
| Arg 1  | 2002 | NA          | NA  | R     | NA                 | NA             | CPV2a      | NA            |
| Arg 2  | 2003 | 4           | F   | D     | V (C)              | +              | CPV2a      | Buenos Aires  |
| Arg 3  | 2003 | 6           | M   | R     | NV                 | +              | CPV2b      | Buenos Aires  |
| Arg 4  | 2003 | 4           | M   | LR    | V (I)              | +              | CPV2a      | Buenos Aires  |
| Arg 5  | 2003 | 135         | M   | NA    | V (C)              | +              | CPV2b      | Buenos Aires  |
| Arg 6  | 2003 | 5           | M   | MB    | V (C)              | +              | CPV2a      | Buenos Aires  |
| Arg 7  | 2003 | NA          | F   | MB    | V (NA)             | +              | CPV2a      | Buenos Aires  |
| Arg 8  | 2003 | 6           | F   | C     | V (C)              | +              | CPV2c      | Buenos Aires  |
| Arg 9  | 2003 | 5           | M   | MB    | NV                 | +              | CPV2a      | Buenos Aires  |
| Arg 10 | 2003 | 4           | F   | R     | V (C)              | +              | CPV2b      | Buenos Aires  |
| Arg 11 | 2003 | 4           | F   | MB    | V (C)              | +              | CPV2a      | Buenos Aires  |
| Arg 12 | 2005 | NA          | M   | AD    | NA                 | NA             | CPV2c      | Buenos Aires  |
| Arg 13 | 2005 | NA          | NA  | NA    | NV                 | NA             | CPV2c      | Buenos Aires  |
| Arg 14 | 2007 | 1           | M   | ST    | V (C)              | +              | CPV2c      | Bahía Blanca  |
| Arg 15 | 2007 | NA          | M   | SFT   | V (NA)             | +              | CPV2c      | Bahía Blanca  |
| Arg 16 | 2007 | 3           | M   | YT    | V (C)              | NA             | CPV2b      | Mar del Plata |
| Arg 17 | 2007 | 3           | F   | P     | V (C)              | NA             | CPV2a      | Mar del Plata |
| Arg 18 | 2007 | 2           | M   | MP    | V (C)              | +              | CPV2a      | Mar del Plata |
| Arg 19 | 2008 | 2           | M   | R     | V (C)              | +              | CPV2c      | Buenos Aires  |
| Arg 20 | 2008 | 2           | NA  | AD    | V (C)              | +              | CPV2c      | Bahía Blanca  |
| Arg 21 | 2008 | 2           | NA  | AD    | V (C)              | +              | CPV2c      | Bahía Blanca  |
| Arg 22 | 2008 | 2           | NA  | AD    | V (C)              | +              | CPV2c      | Bahía Blanca  |
| Arg 23 | 2008 | 2           | NA  | AD    | V (C)              | +              | CPV2c      | Bahía Blanca  |
| Arg 24 | 2008 | 5           | M   | MB    | V (C)              | +              | CPV2c      | Buenos Aires  |
| Arg 25 | 2008 | 2           | F   | MS    | V (C)              | +              | CPV2c      | Tandil        |
| Arg 26 | 2008 | 2           | M   | GS    | V (C)              | +              | CPV2c      | Río Negro     |
| Arg 27 | 2008 | 2           | M   | GS    | V (C)              | +              | CPV2c      | Río Negro     |

F: female; M: male; MB: mixed breed; LR: Labrador Retriever; GS: German Shepherd; R: Rottweiler; D: Doberman; AD: Argentine Dogo; MS: Miniature Schnauzer; ST: Skye Terrier; YT: Yorkshire Terrier; SFT: Smooth Fox Terrier; C: Cocker; P: Poodle; MP: Miniature Poodle; V: vaccinated; NV: non-vaccinated; C: complete vaccination according to its age; I: incomplete vaccination; NA: no information available; Y: yes.

Une étude menée par **VIEIRA MJ *et al.* (2008)** au Portugal a montré l'existence de co-infection CPV-2b/2c. Ainsi, les variations antigéniques rapides peuvent affecter négativement l'efficacité des vaccins actuellement présents, en particulier si les mutations surviennent sur les sites antigéniques majeurs comme c'est aujourd'hui le cas avec VP2. La surveillance de l'apparition de nouvelles mutations est donc essentielle et la recherche pour séquencer tous les nucléotides des différentes souches de CPV doit continuer.

En Europe, **DECARO *et al.* (2009 b)** mentionne, dans sa dernière étude, la divergence des avis concernant l'efficacité des vaccins à base de CPV-2 actuellement utilisés. Il explique que, malgré l'existence d'une immunité croisée, des différences antigéniques peuvent diminuer l'efficacité des anciens vaccins à base de CPV-2 face aux nouvelles souches CPV-2c qui deviennent majoritaires en Europe. Des vaccins à base de CPV-2b doivent être développés et légalisés.

*b. Les vaccins actuels protègent contre CPV-2c ?*

Cependant, les avis concernant l'utilité d'un nouveau vaccin sont partagés. En effet, une étude menée par **SPIBEY N *et al.* en 2007** tente de montrer la capacité du vaccin vivant atténué à base de CPV-2 à protéger les chiots efficacement contre CPV-2c. Cette étude est réalisée sur 12 chiots nés de mères non vaccinées et non exposées au parvovirus. Six de ces chiots sont utilisés comme témoins et ne seront pas vaccinés, les six autres sont vaccinés avec une souche CPV-2 154 à 8 puis à 11 semaines. Quatre semaines plus tard, les chiots sont exposés au parvovirus CPV-2c mis dans leur eau de boisson. Un suivi sérologique, clinique et des échantillons fécaux sont réalisés. Les anticorps sont titrés par séroneutralisation et inhibition par hémagglutination. Les chiots non vaccinés présentent les symptômes de parvovirose dès 4 jours après exposition. Trois seront euthanasiés et trois arriveront à guérir de la maladie. Les chiots vaccinés ne présentent aucun symptôme (TABLEAU 14) et aucune modification hématologique (pas de leucopénie). Le titre en anticorps des chiots vaccinés serait similaire à ceux des animaux guéris qui ont développé leur propre système immunitaire naturellement durant la maladie. Ainsi les vaccins à base de CPV-2 assureraient une protection, même contre les nouvelles souches de parvovirus. Cependant, cette étude est peu significative car elle ne considère que douze chiots. De plus, c'est une seule en faveur des vaccins à base de CPV-2 et il a été démontré à maintes reprises que l'immunité croisée entre les différentes souches ne permet pas une protection correcte face à tous les CPVs.

**Tableau 14** : Observations cliniques sur des chiots vaccinés puis infectés par CPV-2c et sur des témoins non vaccinés mais infectés. D'après **SPIBEY N *et al.* (2007)**

| Animal number | Group     | Clinical observation (days post-challenge) |   |   |   |           |           |           |           |        |    |    |    |    |    |    |
|---------------|-----------|--|---|---|---|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|----|----|----|----|----|----|
|               |           | 0  | 1 | 2 | 3 | 4         | 5         | 6         | 7         | 8      | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| 5256          | Vaccinate | N  | N | N | N | N         | N         | N         | N         | N      | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
| 5260          |           | N  | N | N | N | N         | N         | N         | N         | N      | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
| 9815          |           | N  | N | N | N | N         | N         | N         | N         | N      | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
| 9819          |           | N  | N | N | N | N         | N         | N         | N         | N      | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
| 9823          |           | N  | N | N | N | N         | N         | N         | N         | N      | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
| 9829          |           | N  | N | N | N | N         | N         | N         | N         | N      | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
| 5254          | Control   | N  | N | N | N | M, RA, BF | M, RA, BF | E         | -         | -      | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 5258          |           | N  | N | N | N | M, RA, BF | M, RA, BF | E         | -         | -      | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 9813          |           | N  | N | N | N | M, RA, BF | M, RA, BF | M, RA, BF | PC, RA    | RA     | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
| 9817          |           | N  | N | N | N | M, RA, BF | M, RA, BF | E         | -         | -      | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 9821          |           | N  | N | N | N | M, RA, BF | M, RA, BF | M, RA, BF | PC, RA    | PC, RA | RA | N  | N  | N  | N  | N  |
| 9827          |           | N  | N | N | N | M, RA, BF | M, RA, BF | M, RA, BF | PC, RA    | RA     | N  | N  | N  | N  | N  | N  |
|               |           |  | N | N | N | N         | M, RA, BF | M, RA, BF | M, RA, BF | PC, RA | RA | N  | N  | N  | N  | N  |

N = normal; M = malaise; RA = reduced appetite; BF = blood in faeces; PC = poor condition; E = euthanased.

Une autre étude récente menée par **SCHULTZ R *et al.* (2009)** soulève la question du maintien d'une immunité protectrice contre les souches de CPV actuelles chez les chiens adultes vaccinés depuis leur jeune âge. L'étude montre que des chiens vaccinés avec CPV-2 ou 2a depuis 4 à 9 ans,

chez qui l'on inocule CPV-2c ou 2b par voie oro-nasale, sont protégés à 100%. (TABLEAU 15). Cependant, le nombre de chiens étudié est faible et aucune précision n'est apportée sur le protocole de l'étude.

**Tableau 15** : Taux de protection chez des chiens vaccinés avec CPV-2 ou 2a et CVD (maladie de Carré) après inoculation de CPV-2b et 2c par voie oro-nasale et CVD par voie veineuse. D'après **SCHULTZ R *et al* (2009)**

| <i>Challenge viruses</i> | <i>Number of dogs per group</i> | <i>Years since last vaccine given (average)</i> | <i>Type of CPV-2 vaccine component</i> | <i>CPV titre at PC Day 0 (average log<sub>2</sub>)</i> | <i>CDV titre at PC Day 0 (average log<sub>2</sub>)</i> | <i>Age at challenge in years: range and (average)</i> | <i>Outcome (% protection)</i> |
|--------------------------|---------------------------------|---|--|--|--|---|-------------------------------|
| CDV-SH, CPV-2b           | 10                              | 4.5   | CPV-2                                  | 6.3  | 6.6  | 4–8 (6.2)   | 100                           |
| CDV-SH, CPV-2c           | 10                              | 5.5   | CPV-2                                  | 7.5  | 8.4  | 5–9 (6.8)   | 100                           |
| CDV-SH, CPV-2c           | 10                              | 5.9   | CPV-2a                                 | 7.8  | 8.3  | 7–8 (7.3)   | 100                           |
| CDV-SH, CPV-2c           | 10                              | 4.8   | CPV-2                                  | 8.2  | 5.1  | 5–9 (6.8)   | 100                           |

SH, Synder Hill strain; PC, post challenge.

Ainsi, même si certaines études démontrent l'efficacité du vaccin vivant atténué à base de CPV-2, encore utilisé aujourd'hui face aux nouveaux sous-types, il semblerait qu'une utilisation plus large de vaccins à base de CPV-2b soit plus sécuritaire. L'utilisation d'un vaccin à base de CPV-2c chez le chat est même envisagée pour assurer une protection contre le parvovirus canin et contre la panleucopénie féline.

## 5. Prophylaxie médicale en élevage

En élevage ou en collectivité, les chiots doivent être vaccinés tous les 15 jours, voir toutes les semaines, dès la 6<sup>e</sup> semaine d'âge jusqu'à la 18<sup>e</sup>. Mais plus que l'âge, c'est le taux d'anticorps maternels qui détermine le moment idéal pour la première injection. Il faut utiliser un vaccin monovalent à titre élevé. Tous les chiens du chenil doivent aussi être revaccinés de façon à homogénéiser le niveau immunitaire, en particulier chez les femelles reproductrices. L'inconvénient majeur de ce protocole lourd reste le coût. En pratique, les éleveurs réalisent souvent 3 injections à 6, 9 et 12 semaines.

### III. PROPHYLAXIE SANITAIRE

Comme on a pu l'observer sur le plan épidémiologique, la parvovirose se présente comme une affection hautement contagieuse. La nécessité de réaliser une prophylaxie sanitaire en parallèle d'une prophylaxie médicale est donc plus que jamais indispensable.

#### 1. Prophylaxie sanitaire en élevage sain

En élevage indemne, une prophylaxie sanitaire simple doit être mise en place : la mise en quarantaine des animaux nouvellement introduits permet de limiter l'entrée du virus dans l'élevage. Il doit rester en quarantaine pendant 5 jours, délai qui couvre la durée d'incubation de la maladie. Dès qu'un animal apparaît suspect de parvovirose, un diagnostic de certitudes doit être réalisé. De plus, il faut éviter d'introduire des animaux tant que des chiots de l'élevage ont moins de 20 semaines. La seule autre modalité de protection réellement efficace est la vaccination. En effet, en élevage, les chiots doivent être vaccinés avant leur sevrage et leur vente.

#### 2. Prophylaxie sanitaire en élevage infecté

Lorsqu'un animal est atteint de parvovirose, il faut prendre beaucoup de précautions d'hygiène car le risque de dissémination est important, en particulier dans les élevages ou les cliniques vétérinaires. Considérant la résistance exceptionnelle du virus dans le milieu extérieur, la prophylaxie sanitaire est essentielle mais difficile. **Polycopié de Virologie, ENVA (2006/2007)**

- Dans les cliniques vétérinaires, les patients suspects ou ayant fait l'objet d'un diagnostic de parvovirose doivent être isolés dans une pièce isolée où des cages sont réservées à cet effet. Il faut munir les personnes en contact avec les animaux malades de sur-blouses, sur-chaussures et gants. Le matériel utilisé pour les soins de ces animaux ne doit pas être utilisé avec d'autres patients et doit être désinfecté soigneusement après chaque utilisation. Il est conseillé de laver les animaux avant de les sortir afin d'éliminer les particules virales présentes sur le poil. Une désinfection quotidienne avec de l'eau de javel diluée au 1/30<sup>e</sup> est indispensable.

- En élevage ou en collectivité infecté, un nettoyage complet des locaux contaminés avec de l'eau chaude sous pression deux fois par semaine est indispensable. Chaque jour, les déjections doivent être éliminées, une désinfection avec de l'eau de javel diluée au 1/30<sup>e</sup> ou du formol dilué au 1/100<sup>e</sup> est efficace. Les cadavres doivent être très rapidement éliminés de manière sécuritaire. Durant une épizootie, aucun nouvel animal ne doit être introduit dans l'élevage. Il faut réduire au maximum l'exposition des chiots jusqu'à leur 20<sup>e</sup> semaine par un isolement strict (et pas de sorties en exposition).

Ces mesures doivent être complétées par une vaccination systématique car elles ne permettent pas d'éliminer totalement la présence du parvovirus.

## **CONCLUSION**

Concernant les animaux sains, à l'échelle de la population canine et féline, la prophylaxie médicale, par l'intermédiaire du vaccin, a fait ses preuves. En effet, suite à la panzootie de 1980 et à la mise en place du vaccin, les populations animales infectées ont chuté ces 10 dernières années dans les régions du monde où le protocole vaccinal est correctement suivi. Par exemple, dans les zones urbaines et dans les pays développés qui combattent efficacement ce virus, comme par exemple le Japon, la France, l'Italie et les Etats-Unis, des études montrent la chute du nombre d'infectés par an. De plus, la vaccination diminuerait la réplication virale dans la population canine et donc le nombre de mutations spontanées. En terme de prophylaxie, les vaccins commercialisés pour lutter contre la parvovirose canine sont quasi-exclusivement des vaccins à virus vivant homologue modifié préparés avec des souches de CPV-2 ou/et CPV-2b. La durée de la période critique a été diminuée mais reste un obstacle à la protection totale des chiots contre la maladie. Des études continuent d'être menées pour fabriquer de nouveaux vaccins plus efficaces contre les souches actuelles. La prophylaxie doit toujours être accompagnée de mesures sanitaires rigoureuses pour assurer une lutte efficace contre la parvovirose.

## CONCLUSION

Le parvovirus canin reste une maladie fréquente et redoutée dans l'espèce canine car il est responsable de fortes mortalités malgré une vaccination, aujourd'hui presque systématique. Le parvovirus, et en particulier la souche CPV-2c, affecte actuellement d'autres espèces domestiques tels que le chat, mais aussi les félinés sauvages, les renards et même récemment les ours. De telles transmissions inter-espèces résultent de mutations donnant de nouveaux types antigéniques. Ainsi, l'apparition de nouvelles souches de parvovirus doit être constamment contrôlée par séquençage d'ADN viral retrouvé chez le chien, chez le chat mais aussi chez les espèces sauvages possiblement menacées. De plus, de nouvelles souches de parvovirus émergent dans des pays où la vaccination est peu pratiquée (Vietnam, Corée). Le risque d'apparition d'une nouvelle panzootie existe, similaire à celle survenue en 1980 chez le chien avec CPV-2. Les études et la surveillance du parvovirus et de ses nouvelles souches sont indispensables pour anticiper de tels phénomènes. De nouveaux vaccins associés à des mesures sanitaires rigoureuses tentent d'aider à enrayer la multiplication et l'évolution de ce virus. La vaccination permet elle aussi un contrôle de la maladie et limiterait le risque d'émergence de nouveaux sous-types permis par la capacité de mutation surprenante du parvovirus canin.



# LEXIQUE des ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo-nucléique  
ARN : Acide Ribo-nucléique  
ARNm : Acide Ribonucléique messenger  
Asn : Asparagine  
Asp : Aspartate  
BHoV : Bovine Hokovirus  
BPV : Bovine Parvovirus  
BrEt : Bromure d’Ethidium  
CDV : Canine Distemper Virus  
CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée  
Cl : Chlore  
CPV : Canine parvovirus  
CRFK : culture cellulaire  
DCIT 50 : dose infectieuse 50% sur culture cellulaire  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.  
FPV : Virus de la Panleucopénie Féline  
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching  
GB : Globules Blancs  
Glu : Glutamine  
HA : Hémagglutination  
IGg : Immunoglobulines G  
IHA : Inhibition de l’Hémagglutination  
IV : Intraveineux  
LAMP : Loop-mediated isothermal amplification  
Lys : Lysine  
MaB : Monoclonal antibody  
MDCK : microscopie électronique  
MEV : Virus Entérique du Vison

Mg : Magnésium  
MGB : Minor Groove Binder  
mL : Millilitres  
MVM : Virus minute de la souris  
NK : Natural Killer  
NS : protéine Non Structural  
NS : Séroneutralisation  
PBL : Peripheral Blood Lymphocytes  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PCR : Polymérisation en chaîne  
PH : Potentiel Hydrique  
PHoV : Porcine Hokovirus  
PPRSV : Porcine reproductive and respiratory syndrom virus  
PPV : Porcine Parvovirus  
Rep : Réplication du génome  
RFLP : Fragment Length Polymorphism  
TfR : Récepteur à la Transferrine  
Trh : Thréonine  
TVLP : Physalis Mottle Tymovirus  
UV : Ultra-Violet  
VIH : Virus de l'Immunodeficiency  
VP : Virus protein  
WBC : White Blood Cells

# BIBLIOGRAPHIE

1. ALMBERG E, MECH D, SMITH G, SHELDON J, CRABTREE L. (2009) A serological survey of infectious disease in Yellowstone National Park's canid community. *Plos One*, **4**, issue 9, 1-11
2. ANDRE F. (2006) Electrotransfert de gènes in vivo: optimisation et mécanismes. *These CNRS INAPG*.
3. BARKER IK, POVEY RC, VOIGT DR. (1983) Response of mink, shunk, red fox and raccoon to inoculation with mink virus enteritis, feline panleukopenia and canine parvovirus and prevalence of antibody to parvovirus in wild carnivores in Ontario. *Can J Comp Med*, **47**, 188-197.
4. BATTILANI M, SCAGLIARINI A, TISATO E, TURILLI C, JACOBONI I, CASDIO R, *et al.* (2001). Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. *J. Gen. Virol*, **82**, 1555-1560
5. BESSESEN D, ROMERO M, WAGNER A, HENDERSON K, LIVINGSTON R. (2006) Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice. *J Gen Virol* , **87**, 1543–1556
6. BUONAVOGLIA C, MARTELLA V, PRATELLI A, TEMPESTA M, CAVALLI A, BUONAVOGLIA D *et al.* (2001) Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol*, **82**, 3021-3025
7. BURTONBOY S, CHARLIER P, HERTOOGHS J, LOBMANN M, WISEMAN A, WOODS S (1991) Performace of high titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody. *Vet Rec*, **128**, 377-381
8. CALDERON M G, MATTION N, BUCAFUSCO D, FOGEL F, REMORINI P, LA TORRE J (2009) Molecular characterization of canine parvovirus strain in Argentina: detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *Journal of virological methods*, **159**, 141-145
9. CARMICHAEL L, SCHLAFLER D, HASHIMOTO A. (1994) Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J of Vet Diagnostic Investigation*, **6**, 165-174
10. CASAL JI. (1995) Peptide vaccine against canine parvovirus: identification of two neutralizing subsites in the N terminus of VP2 nd optimization of the amino acid sequence. *J. Virol.*, **69**, 7274-7277

11. CAVALLI A, MARTELLA V, DESARIO C, CAMERO M, LUCIA A, BELLACICCO P *et al.* (2008) Evaluation of the Antigenic Relationships among Canine Parvovirus Type 2 Variants. *Clinical and vaccine immunology*, 534–539
12. CHANDRAN D, SAHANA P, RANI G S, SUGUMAR P, SHANKAR C R, SRINIVASAN V A (2009) Display of neutralizing epitopes of canine parvovirus and a T-cell epitope of the fusion protein of Canine of canine distemper virus on chimeric tymovirus-like particles and it's use as a vaccine candidate both against Canine parvo and Canine distemper. *Vaccine*, **28**, 132-139
13. CHAZEL M. (1996) Evolution du Parvovirus en France depuis 1983 et ses conséquences sur la vaccination. *These ENVL n°96*
14. CHEBOLU S *et DANIEL H* (2009) Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: Expression, Folding, Assembly and Fonctionnality. *Curr Top Microbiol Immunol*, **332**, 33-55.
15. DECARO N, DESARIO C, ADDIE D, MARTELLA V, VIEIRA J, ELIA G. (2007 b) Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus, Europe. *Emerging Infectious Disease*, **13**, 1020-1026
16. DECARO N, DESARIO C, BEALL MJ, CAVALLI A, CAMPOLO M, DIMARCO AA *et al.* (2009 a) Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *Vet J*, **6**.
17. DECARO N, DESARIO C, BILLI M, MARI V, ELIA G, CAVALLI A *et al.* (2009 b) Western European epidemiological survey. *The vet journal*, **10**
18. DECARO N, DESARIO C, ELIA G, CAMPOLO M, LORUSSO A *et al.* (2007 c) Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*, **25**, 1161-1166.
19. DECARO N, DESARIO C, ELIA G, ROBERTO S, MARTELLA V, CAMPOLO M *et al.* (2005) Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest*, **17**, 133–138
20. DECARO N, DESARIO C, LUCENTE MS, AMORISCO F, CAMPOLO M, ELIA G *et al.* (2008) Specific identification of feline panleukopenia virus and its rapid differentiation from canine parvoviruses using minor groove binder probes. *J Virol Methods*, **147**, 67-71.
21. DECARO N, DESARIO C, MARTELLA V, CAMERO M, MANNA L, BELLACICCO A *et al.* (2006 d) First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis*, **53**, 468-472
22. DECARO N, DESARIO C, PARISI A, MARTELLA V, LORUSSO A, MICCOLUPO A *et al.* (2009 c) Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Vet J*, **385**, 5-10.
23. DECARO N, ELIA G, CAMPOLO M, DESARIO C, LUCENTO M, BELACCICCO A *et al.* (2006 a) New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains, *J Virol methods*, **52**, 316-319.
24. DECARO N, ELIA G, DESARIO C, ROBERTO S, MARTELLA V, CAMPOLO M *et al.* (2006 b) A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination

- between 2-based vaccines and field strains of canine parovirus, *J Virol methods*, **136**, 65-70.
25. DECARO N, MARTELLA V, ELIA G, DESARIO C, CAMPOLO M, BUONAVOGLIA D *et al.* (2006 c) Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and fields strains of canine parvovirus type 2b, *J Virol Methods*, **138**, 10-16.
  26. DECARO N, MARTELLA V, ELIA G, DESARIO C, CAMPOLO M, LORUSSO E *et al.* (2007 a) Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs, *Vet Microbiol*, **121**, 39-44.
  27. DIMMIT R (1991) Clinical experience with cross-protective anti-endotoxin antiserum in dogs with parvoviral enteritis, *Canine Pract*, **16**, 23-26.
  28. DOKI M, FUJITA K, MIURA R, YONEDA M, ISHIKAWA Y, TANENO A *et al.* (2006) Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolated from domestic dogs in japan in 1999 and 2000. *Comp Immun, Micro Inf Dis*, **29**, 199-206
  29. FLINOIS JL (1997) Actulité sur la parvovirose canine: importance de nouveaux virus mutants. *Action vét*, **1389**, 21-24
  30. GANIERE N, RUVOEN N, GUEGUEN S, HEGE T, CHAZEL M, AUBERT A. (2000) Identification des types de parvovirus canin circulant en France. *Revue Méd. Vét*, **151**, 43-46
  31. GOVINDASALY L, HUEFFER K, PARRISH C, AGBANDJE-McKENNA M. (2003) Structures of Host Range-Controlling Regions of the Capsids of Canine and Feline Parvoviruses and Mutants. *J. Virol.* **77**, 12211-12221
  32. HAFENSTEIN S, LAURA M, PALERMO S, VICTOR A, KOSTYUCHENKO C, CHUAN XIAO M *et al.* (2007) Asymmetric binding of transferrin receptor to parvovirus capsids. *PNAS*, **104**, 6585–6589
  33. HARBISON C, Chiorinni J, PARRISH C (2008) The Parvovirus capsid odyssey : from the cell surface to the nucleus. *Trends in microbiology*, **16**, 208-214
  34. HARBISON C, LYI S, WEICHER W, PARRISH C (2009) Early steps in cell infection by parvoviruses: Host-specific differences in cell receptor binding but similar endosomal trafficking. *Journal of virology*, **83**, 10504-10514
  35. HIRASAWA T, YONO K, MIKAZUKI K (1996) Detection and genomic analysis of canine parvovirus by the polymerase chain reaction. *J. Vet. Med B*, **43**, 545-554
  36. HONG C, DECARO N, DESARIO C, TANNER P, PARDO MC, SANCHEZ S *et al.* (2007) Occurrence of canine *parvovirus* type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest*, **19**, 535-539
  37. HORIUCHI M, GOTO H, ISHIGURO N, SHINAGAWA M, (1994) Mapping of determinants of the host range for canine cells in the genome of canine parvovirus using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses. *J Gen Virol*, **75**, 1319-1328
  38. HORIUCHI M, GOTO H, ISHIGURO N, SHINAGAWA M. (1994) Mapping of determinants of the host range for canine cells in the genome of canine parvovirus

- using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses. *J Gen Virol*, **75**, 1319–1328.
39. HO-SEONG C, JONG II K, NAM-YONG P. (2006) Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. *J Vet Diagn Invest*, **18**, 81–84
40. HUEFFER K, PARKER J, WEICHERT W, GEISEL R, SGRO J, PARRISH C. (2003) Evolution of Canine Parvovirus Resulted from Virus-Specific Binding to the Canine Transferrin Receptor. *J. Virol*, **77**, 1718-1726
41. IDEXX laboratories [www.idexx.fr/santeanimale/test/parvo](http://www.idexx.fr/santeanimale/test/parvo)
42. IKEDA Y, NAKAMURA K, MIYAZAWA T, TOHYA Y, TAKAHASHI E, MOCHIZUKI M. (2002) Feline Host Range of Canine parvovirus: Recent Emergence of New Antigenic Types in Cats, *Emerging Infectious Diseases*, **8**, 341-346
43. JIANG W, BAKER HJ, SWANGO LJ, SCHORR J, SELF MJ, SMITH BF (1998) Nucleid acid immunization protects dogs against challenge with virulent canine parvovirus. *Vaccine*, **16**, 601-607
44. JOAO VIEIRA M, SILVA E, OLIVEIRA J, LUISA VIEIRA A, DECARO N, DESARIO C *et al.* (2008) Canine parvovirus 2c infection in central Portugal, *J Vet Diagn Invest*, **20**, 488-491.
45. KAPIL S, COOPER A, LAMM C, MURRAY B, REZABEK G, JOHNSTON L *et al.* (2007) Canine Parvovirus Types 2c and 2b Circulating in North American Dogs in 2006 and 2007. *Journal of clinical Microbiology*, **12**, 4044–4047
46. KONTOU M, GOVINDASAMY L, NAM HJ, BRYANT N, LLAMAS-SAIZ AL, FOCES-FOCES C *et al.* (2005) Structural Determinants of Tissue Tropism and In Vivo Pathogenicity for the Parvovirus Minute Virus of Mice. *J. Viro*, **79**, 10931-10943
47. KUWABARA M, NARIAI Y, HORIUCHI Y, NAKAJIMA Y, YAMAGUCHI Y, HORIOKA E *et al* (2006) Immunological effects of recombinant feline Interferon- $\Omega$  (KT-80) administration in the dog. *Microbiol. Immuno.*, **50**, 637-641
48. LACHRETZ A *et* LEJOUR A (1990) Diagnostic ELISA de la parvovirose canine : sensibilité, spécificité et interférence vaccinale. *Rev.Méd.vét*, **141**, 647-653
49. LAU S, WOO P, TSE H, FU C, AU W, CHEN X *et al.* (2008) Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *Journal of General Virology*, **89**, 1840-1848
50. LE PODER S, ELOIT M. (2006) *Pathologie infectieuse virale des carnivores domestiques et des équidés*, Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de virologie,
51. LHALAINEN T, NISKANEN E, JYLHAVA J, PALOHEIMO O, DROSS N, SMOLANDER H *et al.* (2009) Parvovirus Induced alterations in nuclear architecture and dynamics. *Plos One*, **4**, 5948-5953
52. LOPEZ DE TURISMO JA, CORTES E, MARTINEZ C, RUIZ DE YBANEZ R, SIMARRO I, VELA C, CASAL JI. (1992) Recombinant vaccine *for. canine* parvovirus in dogs. *J Virol*, **66**, 2748–2753.

53. LOPEZ-BUENO MG, MATEU J.M. (2003) High mutant frequency in populations of a DNA virus allows evasion from antibody Therapy in an immunodeficient host. *Journal of virology*, p.2701-2708
54. LORUSSO A, MARI V, MARTELLE V, BUONAVOGLIA C. (2007) Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma, *Science direct Vaccine*, **25**, 1161–1166
55. MARTELLA V, CAVALLI A, DECARO N, ELIA G, DESARIO C, CAMPOLO M *et al.* (2005) Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **10**, 1243–1245
56. MARTELLA V, CAVALLI A, PRATELLI A, BOZZO G, CAMERO M, BUONAVOGLIA D *et al.* (2004) A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol*, **42**, 1333–6.
57. MARTELLA V, DECARO N, BUONAVOGLIA C. (2006) Genetic and antigenic variation of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes*, **33**, 11–3.
58. MARTELLA V, DECARO N, ELIA G, BUONAVOGLIA C. (2005) Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J. Vet. Med*, **52**
59. MARTIN V, NAJBAR W, GUEGUENS S, GROUSSON D, EUN H-M, LEBREUX B *et al* (2002) Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Vet. Microbiol.*, **89**, 115-127
60. MEERS J, KYAW-TANNER M, BENSINK Z, ZWIJNENBERG R. (2007) Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia, *Vet J*, **85**, 392-396.
61. MOCHIZUKI M, HORIUCHI M, HIRAGI H, SANGABRIEL M, YASUDA N, UNO T. (1996) Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleucopenia, *Journal of clinical microbiology*, **9**, 2101-2105
62. MONTALI R, BARTZ C, BUSH M. (1987) Parvoviruses. *Virus Infections of Carnivores*, **44**, 419
63. MOON HS, LEE SA, LEE SG, CHOI R, JEOUNG SY, KIM D *et al.* (2008) Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates, *Vet Microbiol*, **131**, 47-56.
64. MORAILLON A. (1982) La Parvovirose canine. *Rec. Med. Vet., numéro special virose du chien et du chat*, **158**, 687-705
65. NAKAMURA K, SAKAMOTO M, IKEDA Y, SATO E, KAWAKAMI K, MIYAZAWA T *et al.* (2001) Pathogenic Potential of Canine Parvovirus Types 2a and 2c in Domestic Cats. *CVI*, **8**, 663-668
66. NAKAMURA M *et al.* (2003) Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, p. 1085–1089
67. NAKAMURA M, TOHYA Y, MIYAWA T, MOCHIZUKI M, PHUNG HT, NGUYEN NH *et al.* (2004) A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol*, **149**, 2261–9.

68. NANDI S, CHIDRI S, KUMAR M, CHAUHAN RS. (2009) Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India, *Res Vet Sci*, **18**.
69. NELSON C, PALERMO L, HAFENSTEIN S, PARRISH C. (2007) Different mechanisms of antibody-mediated neutralization of parvoviruses revealed using the Fab fragments of monoclonal antibodies. *Virology*, **361**, 283–293.
70. OSHIMA T, HISAKA M, KAWAKAMI K, KISHI M, TOHYA Y, MOCHIZUKI M. (2008) Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J Vet Med Sc*, **70**, 769–75.
71. PALERMO L, HUEFFER K and PARRISH CR., (2003) Residues in the Apical Domain of the Feline and Canine Transferrin Receptors Control Host-Specific Binding and Cell Infection of Canine and Feline Parvoviruses. *Journal of Virology*, **77**, 8915–8923.
72. PARKER J, MURPHY W, WANG D, O'BRIEN S, PARRISH C. (2001) Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells. *J. Virol.*, **75**, 3896–3902
73. PARKER J, PARRISH CR. (1997) Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J. Virol*, **71**, 9214–9222
74. PARKER J, WILLIAM J, DAI WANG H, STEPHEN J, COLIN R. (2001) Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells, *Journal of virology*, **75**, 3896–3902
75. PARRISH C, AQUADRO CF, STRASSHEIM ML, EVERMANN JF, SGRO JY, MOHAMMED HO. (1991) Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol*. **65**, 6544–52
76. PARRISH C, O'CONNELL P, EVERMANN JF, CARMICHAEL L. (1985) Natural variation of canine parvovirus. *Science*, **230**, 1046–1048
77. PARRISH C, O'CONNEL P, EVERMANN J, CARMICHAEL L. (1988) Global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J Gen Virol*, **69**, 1111–1116
78. PARRISH C, O'CONNELL P, EVERMANN J, CARMICHAEL L. (2008), Natural Variation of Canine Parvovirus, *Science*, **230**, 1046–1048
79. PAUL M, CARMICHAEL L, CHILDERS H, COTTER S, DAVIDSON A, FORD R *et al* (2006) AAHA Canine Guidelines' for the General Veterinary Practice. *www.AAHA guidelines*
80. POLLOCK R.V.H, COYNE M.J (1993), Canine Parvovirus, *Vet clin North Am. Small. Pract*, **23**, 555–568
81. POTGIETER R, JONES J, PATTON CS, WEBB-MARTIN CS. (1981) Experimental parvovirus infection in dogs. *Can J Comp Med*. **45**, 212–216
82. POTGIETER R, JONES J, PATTON CS. (1981) Experimental Parvovirus Infection in Dogs. *Can. J. comp. Med*. **45**, 212–216

83. PRATELLI A, CAVALLI A, MARTELLA V, TEMPESTA M, DECARO N, LELAND E *et al.* (2001) Canine Parvovirus (CPV) Vaccination: Comparison of Neutralizing Antibody Responses in Pups after Inoculation with CPV2 or CPV2b Modified Live Virus Vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol.* **8**, 612–615.
84. PRATELLI A, CAVALLI A, MARTELLA V, TEMPESTA M, DECARO N, LELAND E *et al.* (2001) Canine Parvovirus (CPV) Vaccination: Comparison of Neutralizing Antibody Responses in Pups after Inoculation with CPV2 or CPV2b Modified Live Virus Vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**, 612-615
85. PRATELLI A, TEMPESTA M, ROPERTO F, SAGAZIO P, CARMICHAEL L. (1999) Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. *J Vet Diagn Invest*, **11**, 550-3
86. REED A, JONES E, MILLER T. (1988) Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus, *Journal of virology* , **62**, 266-276
87. RIBEIRO MCM, ARAUJO JP (2009) Coagglutination for viral DNA preparation of canine parvovirus for molecular diagnosis. *Journal of virological methods*, **161**, 305-307
88. RUBEN P, FRANCIA L, ROMERO V, MAYA L, LOPEZ I, HERNANDEZ M. (2007) First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vetmic*, **3670**, 6
89. SANDALS D, CHARLES POVEY R, MEEK A (1995) Prevalence of bovine parvovirus infection in Ontario dairy cattle. *Can J Vet Res*, **59**, 81-86
90. SASSA Y, FUKUI D, TAKESHI K, MIYAZAWA T. (2006) Neutralizing antibodies against feline parvoviruses in nondomestic felids inoculated with commercial inactivated polyvalent vaccines. *Journal of veterinary medical science* , **68**, 1195-1198
91. SCHMITZ S, COENEN C, KONIG M, THIEL H J, NEIGER R (2009) Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, **21**, 344-345
92. SCHNEIDER B, HO A, TOLBA R, FISCHER H, BLU J and EIS-HU A. (2008) Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. *Journal of General Virology*, **89**, 164-176
93. SCHULTZ R D, THIEL B, MUKHTAR E, SHARP P, LARSON LJ (2009) Age and Long-term protective immunity in dogs and cats. *J Comp Path*, **10**, 1-7
94. SGRO J-Y, TCHAO J, CHAPMAN M, AGBANDGE M, KELLER W et al (1991) X-Ray structure determination. *Science*, **251**, 1446-1454
95. SHACKELTON LA, PARRISH CR, TRUYEN U, HOLMES EC. (2005) High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 379–84.
96. SPIBEY N, GREENWOOD NM, SUTTON D, CHALMERS WS, TARPEY I. (2008) Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol*, **128**, 48-55.

97. STEINEL T, MUNSON L, VAN VUUREN M, TRUYEN U. (2000) Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *Journal of General Virology*, **81**, 345–350
98. STEINEL T, PARRISH C, BLOOM M, TRUYEN U. (2001) Parvovirus Infections in Wild Carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*, **37**, 594–607
99. TRAILOVI D, VIDI B, JOVANOVI M. (2006) Diagnostic methods for canine parvovirus. *Acta Veterinaria*, **56**, 515-527
100. TRUYEN U, GRUENBERG A, CHANG SF, OBERMAIER B, VEIJALAINEN P, PARRISH CR. (1995) Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol*, **69**, 4702–4710.
101. TRUYEN U, PARRISH C, JAMES A. (1992) Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J Virol*, **66**, 5399-5408
102. TRUYEN U, PLATZER G, PARRISH C. (1996) Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Veterinary Record*, **138**, 365-366.
103. TRUYEN U. (2006) Evolution of canine parvovirus a need for new vaccines. *Vet Microbiol*, **117**, 9–13
104. TRUYEN U, GEISLER K, PARRISH C, HERMANN S W, SIEGL G. (1998) No evidence for a role of modified live virus vaccines in the emergence of canine parvovirus. *Journal of general virology*, **79**, 1153-1158
105. TSAO J, CHAPMAN MS, AGBANDJE M, KELLER W, SMITH K, WU H *et al.* (1991) The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*, **22**, 1456–1464.
106. TURISO JAL, CORTES E, MARTINEZ C, YBANES RR, SIMARROL I, VELA C. (1992) Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol.*, **66**, 174-175
107. UMENE K, NUNOUE T. (1990) The genome type of human parvovirus B19 strains isolated in Japan during 1981 differs from types detected in 1986 to 1987: a correlation between genome type and prevalence. *J Gen Virol*, **71**, 983–986.
108. VIHINEN-RANTA M, WEN Y, PARRISH C, JAMES A. (2000) Cytoplasmic Trafficking of the Canine Parvovirus Capsid and Its Role in Infection and Nuclear Transport. *Journal of Virology*, **74**, 4853-4859
109. VOLLMER H. (2005) *Parvovirose canine: etude épidémiologique et diagnostic moléculaire*. Thèse Med vet Lyon, **n°70**
110. WANER T, NAVEH A, WUDOVSKY L, CARMICHAEL L. (1996) Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest*, **8**, 427-432
111. ZEEUW E, LEINECKER N, HERWIG V, SELBITZ HJ, TRUWEN U. (2007) Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Journal of General Virology*, **88**, 420–427