



HAL
open science

Mise en évidence pour la première fois dans le sperme de chien de l'herpèsvirus canin (CHV) : contribution à l'étude du risque de transmission vénérienne par PCR temps réel et analyse complémentaire sérologique

Chloë Charles

► To cite this version:

Chloë Charles. Mise en évidence pour la première fois dans le sperme de chien de l'herpèsvirus canin (CHV) : contribution à l'étude du risque de transmission vénérienne par PCR temps réel et analyse complémentaire sérologique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-04021592

HAL Id: dumas-04021592

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04021592>

Submitted on 9 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2022 - Thèse n°33

**MISE EN EVIDENCE POUR LA PREMIERE FOIS DANS LE SPERME DE
CHIEN DE L'HERPESVIRUS CANIN (CHV) : CONTRIBUTION A L'ETUDE
DU RISQUE DE TRANSMISSION VENERIENNE PAR PCR TEMPS REEL
ET ANALYSE COMPLEMENTAIRE SEROLOGIQUE**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue

publiquement devant l'UFR de

Médecine de l'Université de Nantes

le 19/09/2022

par

Chloë CHARLES

Sous la direction de

Djemil BENCHARIF et Lionel MARTIGNAT

- Président du jury :** **Monsieur Patrice LOPES**, Professeur Émérite de la Faculté de Médecine de Nantes
- Membres du jury :** **Monsieur Djemil BENCHARIF**, Maître de Conférences habilité à diriger des recherches à ONIRIS – Nantes
Monsieur Lionel MARTIGNAT, Professeur en Biologie Moléculaire & Biotechnologies à ONIRIS – Nantes
Madame Laëtitia DORSO, Diplômée du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire, Praticienne Hospitalière en Autopsie à ONIRIS – Nantes
- Membre invité :** **Madame Fanny RENOIS-MEURENS**, Professeure et Maître de Conférence Habilité à Diriger des Recherches à ONIRIS - Nantes

ANNEE 2022 - Thèse n°33

**MISE EN EVIDENCE POUR LA PREMIERE FOIS DANS LE SPERME DE
CHIEN DE L'HERPESVIRUS CANIN (CHV) : CONTRIBUTION A L'ETUDE
DU RISQUE DE TRANSMISSION VENERIENNE PAR PCR TEMPS REEL
ET ANALYSE COMPLEMENTAIRE SEROLOGIQUE**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue

publiquement devant l'UFR de

Médecine de l'Université de Nantes

le 19/09/2022

par

Chloë CHARLES

Sous la direction de

Djemil BENCHARIF et Lionel MARTIGNAT

- Président du jury :** **Monsieur Patrice LOPES**, Professeur Émérite de la Faculté de Médecine de Nantes
- Membres du jury :** **Monsieur Djemil BENCHARIF**, Maître de Conférences habilité à diriger des recherches à ONIRIS – Nantes
Monsieur Lionel MARTIGNAT, Professeur en Biologie Moléculaire & Biotechnologies à ONIRIS – Nantes
Madame Laëtitia DORSO, Diplômée du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire, Praticienne Hospitalière en Autopsie à ONIRIS – Nantes
- Membre invité :** **Madame Fanny RENOIS-MEURENS**, Professeure et Maître de Conférence Habilité à Diriger des Recherches à ONIRIS - Nantes

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Nutrition et Endocrinologie		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC) Adélie SALIN (CERC)	
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie	Hervé SEBBAG (MC)	
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC) Florence TEXIER (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (CERC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC)	Emmanuel JAFFRES (MC) Mathilde MOSSER (mc) Boris MISERY (CERC) Raouf TAREB (MC)
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr) Lucile MARTIN (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (CERC) Ségolène CALVEZ (MC) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (CERC) Kenny OBERLE (CERC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Eric DROMIGNY (MC HDR) Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR) Sofia STRUBBIA (CERC)

Département DSC Sciences cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – Adjoint : Olivier GAUTHIER		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (CERC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVILLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (MC HDR) Lamia BRIAND (MC HDR)
Département GPA Génie des procédés alimentaires		
Responsable : Sébastien CURET-PLOQUIN – Adjointe : Vanessa JURY		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (MC HDR) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
Département MSC Management, statistiques et communication		
Responsable : Samira ROUSSELIERE – Adjointe : Evelyne VIGNEAU		
Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr)	Véronique CARIOU (MC HDR) Philippe COURCOUX (MC) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GOYLER (Ens. Cont.) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel, PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole, HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens. Cont. : Enseignant Contractuel

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénoms de l'auteur : CHARLES Chloë, Élise, Lucie
- Année de soutenance : 2022.
- Titre de la thèse : « Mise en évidence pour la première fois dans le sperme de chien de l'herpèsvirus canin (CHV) : contribution à l'étude du risque de transmission vénérienne par PCR temps-réel et analyse complémentaire sérologique. »
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes.
- École de soutenance: Oniris : École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 236 p.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....
TABLE DES MATIERES.....	6
TABLE DES ANNEXES.....	11
TABLE DES FIGURES.....	12
TABLE DES TABLEAUX.....	14
TABLE DES ABBREVIATIONS ET DES SIGLES	17
INTRODUCTION	20
PREMIERE PARTIE : RAPPELS ET GENERALITES SUR LA REPRODUCTION CANINE.....	21
1.1. RAPPELS DE PHYSIOLOGIE SEXUELLE.....	22
1.1.1. PUBERTE CHEZ LA CHIENNE	22
1.1.1.1. <i>Définition</i>	22
1.1.1.2. <i>Déclenchement de la puberté et implications hormonales chez la chienne</i>	22
1.1.1.3. <i>Facteurs influençant la survenue de la puberté chez la chienne</i>	23
1.1.2. SAISONNALITE DU CYCLE CHEZ LA CHIENNE	24
1.1.3. LE CYCLE SEXUEL DE LA CHIENNE.....	24
1.1.3.1. <i>Le proestrus</i>	24
1.1.3.2. <i>L'œstrus</i>	25
1.1.3.3. <i>Le métœstrus</i>	25
1.1.3.4. <i>L'anœstrus</i>	25
1.1.4. LA GESTATION	26
1.1.4.1. <i>La phase embryoblastique</i>	27
1.1.4.2. <i>La phase embryonnaire et placentation</i>	27
1.1.4.3. <i>La période fœtale</i>	28
1.1.5. LA PARTURITION CHEZ LA CHIENNE.....	28
1.1.5.1. <i>Les signes cliniques associés à la parturition</i>	28
1.1.5.2. <i>Les stades de la parturition</i>	28
1.1.5.3. <i>Les modifications hormonales et chimiques associées à la parturition (Figure 3)</i>	29
1.1.6. LE POST-PARTUM	30
1.1.6.1. <i>Chez la chienne</i>	30
1.1.6.2. <i>Chez le chiot</i>	31
1.1.7. PUBERTE CHEZ LE CHIEN	31
1.1.7.1. <i>Définition</i>	31
1.1.7.2. <i>Déclenchement de la puberté et implications hormonales chez le chien</i>	32
1.1.8. LA SPERMATOGENESE	32
1.1.8.1. <i>La spermatocytogenèse</i>	33
1.1.8.2. <i>La spermiogenèse</i>	33
1.1.8.3. <i>La spermiation (O'Donnell et al., 2011)</i>	34
1.2. MODES DE REPRODUCTION DANS L'ESPECE CANINE	34
1.2.1. L'ACCOUPLEMENT NATUREL	34
1.2.1.1. <i>La saillie</i>	34
1.2.1.2. <i>L'érection</i>	34
1.2.1.2.1. <i>L'intromission</i>	35
1.2.1.2.2. <i>L'émission</i>	35

1.2.1.2.3.	<i>L'éjaculation</i>	35
1.2.1.2.4.	La phase post éjaculation	36
1.2.1.2.4.1.	Le trajet des gamètes mâles et leur capacitation.....	36
1.2.1.2.4.2.	La fécondation.....	37
1.2.2.	L'INSEMINATION ARTIFICIELLE (MASON 2018)	37
1.2.2.1.	<i>Prérequis à l'insémination artificielle</i>	37
1.2.2.1.1.	Collecte du sperme, évaluation et conservation	37
1.2.2.1.2.	Détermination du moment optimal d'insémination de la femelle	38
1.2.2.1.2.1.	Dosage de l'hormone lutéinisante (LH).....	38
1.2.2.1.2.2.	Dosage de la progestérone	38
1.2.2.1.2.3.	Cytologie vaginale	39
1.2.2.2.	<i>Description et réalisation des différents types d'insémination artificielle disponibles</i>	39
1.2.2.2.1.	Insémination vaginale.....	39
1.2.2.2.2.	Insémination transcervicale par endoscopie	40
1.2.2.2.3.	Insémination par cathétérisme norvégien.....	40
1.2.2.2.4.	Insémination intra-utérine par laparotomie.....	40
1.2.2.2.5.	Insémination par laparoscopie	40

DEUXIEME PARTIE : L'HERPESVIROSE CANINE.....47

2.1.	L'HERPESVIRUS CANIN	
2.1.1.	DECOUVERTE ET HISTORIQUE.....	43
2.1.2.	TAXONOMIE.....	43
2.1.3.	PHYLOGENIE	45
2.1.4.	STRUCTURE DU VIRION	47
2.1.5.	GENOME.....	48
2.1.6.	ENTREE DU VIRUS DANS LES CELLULES CIBLES	49
2.1.7.	CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES	53
2.1.8.	CULTURE VIRALE ET TROPISME CELLULAIRE	53
2.2.	EPIDEMIOLOGIE	55
2.2.1.	ÉPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE.....	55
2.2.1.1.	<i>Espèces cibles</i>	55
2.2.1.2.	<i>Sources et réservoirs</i>	56
2.2.1.3.	<i>Modes de transmissions et matières virulentes</i>	56
2.2.1.3.1.	Chez le chiot de moins de 3 semaines	56
2.2.1.3.2.	Chez le chiot de plus de 3 semaines et les chiens adultes	57
2.2.1.4.	<i>Séroprévalence du CHV à l'échelle mondiale</i>	57
2.2.2.	ÉPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE.....	59
2.2.2.1.	<i>Relation entre âge des animaux et séropositivité vis-à-vis du CHV</i>	60
2.2.2.2.	<i>Lien entre sexe et positivité au CHV</i>	61
2.2.2.3.	<i>Influence de paramètres reproducteurs sur la positivité au CHV</i>	61
2.2.2.4.	<i>Influence des conditions de logement sur la positivité au CHV</i>	62
2.2.2.5.	<i>Influence de la participation à des événements collectifs dans la positivité au CHV</i>	62
2.2.2.6.	<i>Influence de l'hygiène sur la séroprévalence du CHV</i>	62
2.2.2.7.	<i>Étude du lien entre le cycle œstral de la chienne et la positivité au CHV</i>	63
2.3.	PATHOGENIE DE L'HERPESVIRUS CANIN	63
2.3.1.	PATHOGENIE CHEZ LE CHIOT DE MOINS DE 3 SEMAINES.....	63
2.3.2.	PATHOGENIE CHEZ LE CHIOT DE PLUS DE 3 SEMAINES ET LE CHIEN ADULTE	64
2.3.3.	PATHOGENIE LORS D'UNE INFECTION IN UTERO	64
2.3.4.	CHV ET IMMUNITE.....	65
2.3.5.	LA LATENCE DU CHV	66
2.4.	DIAGNOSTIC	67
2.4.1.	DIAGNOSTIC CLINIQUE	67
2.4.1.1.	<i>Forme respiratoire</i>	67
2.4.1.2.	<i>Forme génitale</i>	68

2.4.1.2.1.	Chez la femelle	68
2.4.1.2.2.	Chez le mâle (Hill et al., 1974)	69
2.4.1.3.	<i>Forme oculaire</i>	69
2.4.1.4.	<i>Forme abortive et autres troubles de la reproduction</i>	71
2.4.1.5.	<i>Forme systémique chez le chiot âgé de moins de 3 semaines</i>	71
2.4.2.	DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL.....	72
2.4.2.1.	<i>Diagnostic indirect : la sérologie</i>	72
2.4.2.2.	<i>Diagnostic direct : la virologie</i>	75
2.4.2.2.1.	Généralités concernant la PCR en temps-réel	75
2.4.2.2.1.1.	Principe général et définition de la PCR en temps-réel.....	75
2.4.2.2.1.2.	Historique de la PCR en temps-réel.....	76
2.4.2.2.1.4.	Interprétation d'un résultat de PCR en temps-réel	77
2.4.2.2.2.	Les différentes techniques PCR utilisées pour détecter le CHV	78
2.4.3.	DIAGNOSTIC POST MORTEM	84
2.4.3.1.	<i>Lésions macroscopiques</i>	84
2.4.3.1.1.	Chez le chiot de moins de 3 semaines ou les fœtus morts du CHV	84
2.4.3.1.2.	Chez les adultes atteints du CHV	87
2.4.3.2.	<i>Lésions microscopiques</i>	87
2.4.4.	DIAGNOSTICS DIFFERENTIELS	90
2.4.4.1.	<i>Diagnostic différentiel de la forme abortive</i>	90
2.4.4.2.	<i>Diagnostic différentiel de la mortalité néonatale</i>	91
2.4.4.3.	<i>Diagnostic différentiel de la forme respiratoire</i>	92
2.4.4.4.	<i>Diagnostic différentiel des formes génitales</i>	92
2.4.4.5.	<i>Diagnostic différentiel de la forme oculaire</i>	92
2.5.	TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE	92
2.5.1.	TRAITEMENTS DES DIVERSES FORMES DU CHV	92
2.5.2.	PROPHYLAXIE MEDICALE : LA VACCINATION	95
2.5.3.	PROPHYLAXIE SANITAIRE.....	97
2.5.3.1.	<i>L'hygiène</i>	97
2.5.3.2.	<i>La zootechnie</i>	97
2.5.3.3.	<i>Le traitement thermique des chiots</i>	98

TROISIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE102

3.1.	MATERIEL ET METHODE	102
3.1.1.	ANIMAUX ET ECHANTILLONS TESTES LORS DE CETTE ETUDE	102
3.1.1.1.	<i>Prélèvements biologiques</i>	102
3.1.1.1.1.	Provenances des animaux intégrés à l'étude	102
3.1.1.1.2.	Conditions de réalisation des prélèvements.....	102
3.1.1.1.2.1.	Prélèvements sanguins	102
3.1.1.1.2.2.	Écouvillons vaginaux	103
3.1.1.1.2.3.	Écouvillons préputiaux	103
3.1.1.1.2.4.	Spermes	104
3.1.1.1.2.5.	Organes	104
3.1.2.	CULTURES CELLULAIRES DE CELLULES MDCK INFECTEES	105
3.1.3.	EXTRACTIONS ADN DES ECHANTILLONS	105
3.1.3.1.	<i>Principe général des extractions d'ADN</i>	105
3.1.3.2.	<i>Protocoles d'extractions utilisés selon les types de prélèvements</i>	106
3.1.3.3.	<i>Mesures des concentrations en ADN une fois les échantillons extraits et interprétation des valeurs obtenues</i>	106
3.1.4.	LES DIFFERENTES METHODES PCR ET TESTS UTILISES	107
3.1.4.1.	<i>PCR en temps réel</i>	107
3.1.4.1.1.	Travail préalable à la réalisation de nos PCR en temps réel et choix des tests utilisés en interne à ONIRIS ..	108
3.1.4.1.1.1.	Choix des tests PCR temps réel à comparer	108
3.1.4.1.1.2.	Mise en œuvre de la comparaison des tests PCR en temps réel retenus.....	109
3.1.4.1.2.	La PCR en temps réel utilisant la technologie EvaGreen®	111
3.1.4.1.2.1.	Préparation en amont de la réaction	111

3.1.4.1.2.2.	Fonctionnement de la PCR temps réel Evagreen®	113
3.1.4.1.3.	Mode opératoire de la PCR en temps réel Taqman utilisée	115
3.1.4.2.	<i>La qPCR Taqman, SCANELIS</i>	117
3.1.4.3.	<i>Électrophorèse sur gel d'agarose</i>	117
3.1.5.	LA SEROLOGIE	118
3.2.	RESULTATS	118
3.2.1.	INFORMATIONS GENERALES ET ELEMENTS ANAMNESTICO-CLINIQUES CONCERNANT LES ANIMAUX PRELEVES	118
3.2.2.	EXTRACTIONS ADN DES DIVERS ECHANTILLONS PRELEVES	127
3.2.2.1.	<i>Sangs totaux</i>	127
3.2.2.1.1.	Femelles.....	127
3.2.2.1.2.	Mâles.....	130
3.2.2.2.	<i>Écouvillons vaginaux</i>	131
3.2.2.3.	<i>Écouvillons préputiaux</i>	133
3.2.2.4.	<i>Spermes</i>	134
3.2.2.5.	<i>Organes du chiot mort moins de 24h post-partum</i>	136
3.2.3.	PCR TEMPS REEL	137
3.2.3.1.	<i>Résultats de la comparaison des différents tests PCR temps-réel et tests retenus</i>	137
3.2.3.1.1.	Résultats des 5 tests comparés en PCR temps-réel	137
3.2.3.1.2.	Tests retenus pour l'analyse des échantillons en PCR temps-réel.....	142
3.2.3.2.	<i>PCR en temps réel EvaGreen® réalisées à Oniris</i>	142
3.2.3.2.1.	Sangs totaux	143
3.2.3.2.1.1.	Femelles	143
3.2.3.2.1.2.	Mâles.....	146
3.2.3.2.2.	Écouvillons vaginaux.....	147
3.2.3.2.3.	Écouvillons préputiaux.....	151
3.2.3.2.4.	Spermes	152
3.2.3.2.4.1.	Phase liquide spermatique	152
3.2.3.2.4.2.	Culot cellulaire spermatique	153
3.2.3.3.	<i>PCR temps réel Taqman réalisées à Oniris</i>	154
3.2.3.3.1.	Sang total.....	155
3.2.3.3.1.1.	Femelles	155
3.2.3.3.1.2.	Mâles.....	155
3.2.3.3.2.	Écouvillons vaginaux	156
3.2.3.3.3.	Écouvillons préputiaux.....	157
3.2.3.4.	<i>Résultats des PCR quantitatives réalisées par le laboratoire SCANELIS</i>	157
3.2.3.4.1.	Écouvillons vaginaux	158
3.2.3.4.2.	Écouvillons préputiaux.....	160
3.2.3.4.3.	Spermes totaux.....	160
3.2.4.	SEROLOGIE	161
3.2.5.	RESULTATS D'AUTOPSIE.....	163
3.3.	DISCUSSION	163
3.3.1.	DETECTION DE L'ADN DE L'HERPESVIRUS CANIN DANS LE SPERME	164
3.3.1.1.	<i>Présence d'ADN viral de CHV dans le sperme</i>	164
3.3.1.2.	<i>Écouvillonnages préputiaux et positivité au CHV</i>	165
3.3.1.3.	<i>Focus sur les mâles positifs</i>	165
3.3.1.3.1.	Cas du mâle M-007	165
3.3.1.3.2.	Cas du mâle M-012	166
3.3.1.3.3.	Cas du mâle M-014	166
3.3.1.4.	<i>Comment interpréter des résultats négatifs ?</i>	167
3.3.1.5.	<i>Questions en suspens et perspectives chez les mâles</i>	168
3.3.1.5.1.	Latence virale.....	168
3.3.1.5.2.	Proposition de protocole pour l'identification de la fraction spermatique porteuse du CHV	169
3.3.1.5.3.	Durée d'excrétion du CHV dans le sperme	170
3.3.2.	DETECTION DE L'HERPESVIRUS CANIN CHEZ LA FEMELLE	170
3.3.2.1.	<i>Détection du CHV chez les femelles</i>	170
3.3.2.1.1.	<i>Cas de la femelle F-023</i>	171
3.3.2.1.2.	Cas de la femelle F-051.....	172
3.3.2.1.3.	Cas de la femelle F-068.....	173

3.3.3.	INTERPRETATION DES RESULTATS SEROLOGIQUES	176
3.3.3.1.	Étude sérologique sur chiens d'élevages reproducteurs	176
3.3.3.1.1.	Résultats de notre étude sérologique et comparaison à d'autres études	176
3.3.3.1.2.	Origine probable des anticorps anti-CHV chez les animaux testés	176
3.3.3.2.	<i>Interprétation d'un résultat sérologique dans le cadre du CHV</i>	177
3.3.3.2.1.	Animal séropositif	177
3.3.3.2.2.	Animal séronégatif	177
3.3.3.2.3.	Distinction anticorps vaccinaux et anticorps en réponse à une infection par le CHV	178
3.3.4.	PERSPECTIVES, AMELIORATIONS ET UTILISATION DE NOTRE PCR TEMPS REEL EVAGREEN®	178
3.3.4.1.	<i>Avantages mis en évidence au cours de l'étude</i>	178
3.3.4.2.	<i>Améliorations possibles</i>	179
3.3.4.3.	<i>Choix de la technologie EvaGreen® par rapport à la technologie SybrGreen®</i>	181
3.3.4.4.	<i>Intérêts de la chimie Taqman par rapport à la chimie EvaGreen®</i>	182
3.3.5.	GESTION DU CHV EN ÉLEVAGE EN FONCTION DES RESULTATS	182
3.3.5.1.	<i>Cas d'un animal négatif en PCR et en sérologie</i>	182
3.3.5.2.	<i>Mesures idéales de gestion de la reproduction face au CHV</i>	183
3.3.5.3.	<i>Statut de l'élevage et introduction de nouveaux animaux</i>	183
3.3.5.4.	<i>Portage latent du CHV</i>	184
3.3.5.5.	<i>Signes d'alertes en élevage</i>	184
3.3.5.6.	<i>Intérêt de réaliser des PCR sur le sang des animaux en élevage</i>	185
CONCLUSION		191
BIBLIOGRAPHIE		192
ANNEXES		220

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1: Lettre de consentement éclairé à destination des propriétaires pour réalisation de prélèvements sur une chienne	215
Annexe 2 : Lettre de consentement éclairé à destination des propriétaires pour réalisation de prélèvements sur un chien	217
Annexe 3 : Protocole de séparation des phases liquidienne et cellulaire spermatiques	219
Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN sur écouvillons vaginaux et préputiaux.....	220
Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN sur sang total	221
Annexe 6 : Protocole utilisé pour l'extraction d'ADN du culot cellulaire spermatique et des organes prélevés.....	222
Annexe 7 : Protocole utilisé pour l'extraction d'ADN viral dans la phase liquidienne spermatique	223
Annexe 8 : Rapport d'autopsie du chiot mort de la chienne F-070.....	224
Annexe 9 : Proposition de protocole de purification de sperme contaminé par des particules virales en position extracellulaire (d'après Semperini <i>et al.</i> , 1992).....	227

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Régulation hormonale et déclenchement de la puberté chez la chienne (d'après Lea et <i>al.</i> , 2019)	23
Figure 2 : Évolution de la population cellulaire vaginale au cours du cycle œstral de la chienne (Gogny et <i>al.</i> , 2010)	26
Figure 3 : Événements correspondant au début de la parturition chez la chienne et débutant par la sécrétion fœtale de cortisol (d'après Reece 2009).....	30
Figure 4 : Déclenchement de la puberté chez le chien (d'après Lea et <i>al.</i> , 2019).....	32
Figure 5 : Arbre phylogénétique non raciné des protéines équivalentes codées par les gènes gD des alphaherpèsvirus. Les longueurs des branches sont proportionnelles aux distances génétiques. Les nombres représentent les pourcentages de l'analyse par quartet (Martina et <i>al.</i> , 2003).	45
Figure 6 : Arbre phylogénétique des ADN polymérases des Varicellovirus. L'arbre a été ancré sur HSV1, qui est un membre du genre Simplexvirus. Les valeurs bootstrap sont indiquées aux nœuds sous forme de fractions. La barre d'échelle indique les substitutions par résidu d'acide aminé (Papageorgiou et <i>al.</i> , 2016).....	46
Figure 7 : Représentation schématique du virus CHV	47
Figure 8 : Observations au microscope électronique du CHV (→) dans l'espace extracellulaire sur des cellules rénales infectées (Strandberg et <i>al.</i> , 1965).....	48
Figure 9 : Schéma simplifié de l'organisation génomique générale du CHV	49
Figure 10 : Pétéchies sur le pénis d'un mâle atteint du CHV (Service de Pathologie de la Reproduction, Oniris).....	69
Figure 11 : Principe général de l'immunofluorescence indirecte (créée sur Biorender.com)	73
Figure 12: Exemple de courbes d'amplifications obtenues suite à la réalisation d'une PCR temps-réel utilisant un intercalant	78
Figure 13 : Principe et principales étapes de fonctionnement de la PCR temps-réel Taqman (créée sur Biorender.com)	81
Figure 14 : Photographie d'un rein de chiot mort du CHV à 7 jours d'âge. Visualisation d'un rein moucheté par des zones hémorragiques (Dr Laëtitia DORSO, Autopsie-Service, Oniris).....	85
Figure 15 : Photographie en coupe longitudinale d'un rein de chiot mort du CHV à 7 jours d'âge. Le cortex présente de nombreuses hémorragies rénales extensives conférant un aspect « marbré	

» aux reins, associées à des ponctuations blanchâtres, de disposition radiée à la coupe, intéressant à la fois le cortex et la médulla (Dr Laëticia DORSO, Autopsie-Service, Oniris)..... 85

Figure 16 : Visualisation de 2 lobes hépatiques d'un chiot mort du CHV à 7 jours d'âge. Présence de foyers beiges bien délimités compatibles avec des zones de nécrose, parfois coalescents (Dr Laëticia DORSO, Autopsie-Service, Oniris)	86
Figure 17 : Rate d'un chiot mort du CHV à 7 jours d'âge. Présence d'innombrables foyers hémorragiques et blanchâtres de 1 à 2 mm de diamètre, disséminés sur l'ensemble du parenchyme splénique (Dr Laëticia DORSO, Autopsie-Service, Oniris)	86
Figure 18 : Principales étapes de préparation du mix de PCR en temps réel EvaGreen® (créée sur Biorender.com)	112
Figure 19: Schéma d'une plaque 96 puits classique utilisée pour les PCR temps-réel (créée sur Biorender.com)	113
Figure 20 : Principales étapes et principe de fonctionnement de la PCR en temps réel EvaGreen® (créée sur Biorender.com)	114
Figure 21: Exemple de courbe de dissociation obtenue via la technique EvaGreen®	115
Figure 22 : Principales étapes de préparation du mix de PCR temps-réel Taqman (créée sur Biorender.com)	116
Figure 23 : Système d'électrophorèse sur gel (créée sur Biorender.com)	117
Figure 24 : Exemple de courbe d'amplification de l'amorce « LED-TK » (Taqman)	137
Figure 25 : Exemple de courbe d'amplification de l'amorce « DEC-gB » (Taqman).....	138
Figure 26 : Courbe d'amplification de l'amorce LM-gB (EvaGreen®)	139
Figure 27 : Courbe d'amplification de l'amorce LM-Tk (EvaGreen®)	139
Figure 28 : Courbe de dissociation obtenue en EvaGreen® pour le test « LM-gB ».....	140
Figure 29 : Courbe de dissociation obtenue en EvaGreen® pour le test « LM-Tk ».....	141
Figure 30 : Électrophorèse du produit de PCR temps-réel EvaGreen® de l'échantillon de sang total de la femelle F-068.....	146
Figure 31 : Courbe d'amplification en PCR temps-réel EvaGreen® avec les amorces « LM-gB » mettant en évidence la positivité de l'échantillon d'ADN vaginal de la chienne F-023.....	150
Figure 32 : Courbe de dissociation des PCR temps-réel EvaGreen® avec les amorces « LM-gB » mettant en évidence que la température de dissociation du produit d'amplification de l'ADN vaginal de F-023 correspond à celle des échantillons standards positifs au CHV	151

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Liste non exhaustive de Varicellovirus touchant divers mammifères ainsi que les maladies provoquées par ceux-ci.....	44
Tableau II : Glycoprotéines connues des principaux alphaherpèsvirus et leurs récepteurs cellulaires (Azab et <i>al.</i> , 2017)	51
Tableau III : Influence de la température sur l’infectivité et l’inactivation du CHV	53
Tableau IV : Tropismes cellulaires d’alphaherpèsvirus autres que le CHV chez divers mammifères	54
Tableau V : Recensement des espèces exposées au CHV par détection d’anticorps dirigés contre ce virus.....	56
Tableau VI : Récapitulatif des séroprévalences du CHV dans le monde, depuis 1974, dans l’ordre alphabétique des pays concernés.....	58
Tableau VII : liste des études mettant en évidence un lien entre séropositivité ou détection du CHV et âge des animaux	60
Tableau VIII : Résumé des diverses formes oculaires de CHV	70
Tableau IX : Liste non exhaustive des différentes techniques sérologiques utilisées au cours des années afin de détecter des anticorps anti CHV dans des études depuis 1969.....	74
Tableau X : Tableau non exhaustif récapitulant les caractéristiques des différentes techniques PCR utilisées au cours des 30 dernières années ainsi que les prélèvements biologiques sur lesquelles elles ont été effectuées.....	79
Tableau XI : Modalités de gestion des prélèvements en vue de la recherche de CHV par la technique qPCR d’après le laboratoire SCANELIS (Fontbonne 2011)	82
Tableau XII : Tableau récapitulatif des moyens de diagnostic de l’herpèsvirose canine en pratique vétérinaire quotidienne (Legault 2007) (Fontbonne 2011)	83
Tableau XIII : Liste des lésions macroscopiques par organes, retrouvées chez tous les chiots de moins de 3 semaines ou fœtus morts du CHV (d’après (Carmichael et <i>al.</i> , 1965a).....	84
Tableau XIV : Liste des lésions macroscopiques par organes, retrouvées chez certains des chiots de moins de 3 semaines et des fœtus morts du CHV (d’après Carmichael et <i>al.</i> , 1965a)	87
Tableau XV : Résumé des principales lésions microscopiques retrouvées lors d’une infection par le CHV.....	88
Tableau XVI : Diagnostic différentiel des avortements dans l’espèce canine (Poulet 2005)	91

Tableau XVII : Diagnostic différentiel de la mortinatalité dans l'espèce canine (Poulet 2005)	91
Tableau XVIII : Liste non exhaustive des principaux traitements testés et ayant obtenus des résultats dans le traitement d'affections dues au CHV	93
Tableau XIX : Résumé des caractéristiques du vaccin « Eurican Herpes 205® » d'après son RCP	96
Tableau XX : Caractéristiques des différents tests comparés en PCR temps-réel.....	109
Tableau XXI : Recommandations pour la constitution du mix réactionnel pour qPCR EvaGreen® selon les indications du fabricant	112
Tableau XXII : Recommandations pour la constitution du mix réactionnel pour qPCR Taqman selon les indications du fabricant	116
Tableau XXIII : Description et caractéristiques des animaux inclus pour la détection du CHV	118
Tableau XXIV : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN extraits de sang total prélevé sur les femelles	128
Tableau XXV : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN extraits de sang total prélevé sur les mâles.....	130
Tableau XXVI : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN extraits à partir des cellules prélevées par cytobrosses vaginales	131
Tableau XXVII : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN des cellules prélevées par cytobrosses préputiales.....	134
Tableau XXVIII : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN de cellules spermatiques et de liquides spermatiques.....	135
Tableau XXIX : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN extraits de divers organes de l'unique chiot mort de la chienne F-070	136
Tableau XXX : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les ADN des sangs totaux des chiennes et valeurs de Cq de l'échantillon positif	143
Tableau XXXI : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les ADN de sang total des chiens mâles.....	147
Tableau XXXII : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les ADN des écouvillons vaginaux effectués sur les chiennes et valeurs de Cq des échantillons positifs	148
Tableau XXXIII : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » sur les ADN des écouvillons préputiaux	151

Tableau XXXIV : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les fractions liquidiennes spermatiques et valeurs de Cq des échantillons positifs.....	152
Tableau XXXV : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les fractions cellulaires spermatiques et valeurs de Cq des échantillons positifs	153
Tableau XXXVI : Résultats des PCR temps-réel Taqman utilisant les amorces « LED-Tk» réalisées sur les ADN de sang total des 3 chiennes positives au niveau vaginal en EvaGreen® « LM-gB » et valeur de Cq de l'échantillon positif	155
Tableau XXXVII : Résultats des PCR temps-réel Taqman utilisant les amorces « LED-TK» réalisées sur les ADN extraits de sang total des 3 mâles aux spermés positifs	155
Tableau XXXVIII : Résultats des PCR temps-réel Taqman utilisant les amorces « LED-TK» réalisées sur les ADN des écouillons vaginaux et valeurs de Cq des échantillons positifs	156
Tableau XXXIX : Résultats des PCR temps-réel Taqman utilisant les amorces « LED-TK» réalisées sur les ADN d'écouvillons préputiaux des 3 mâles aux spermés positifs	157
Tableau XL : Résultats des PCR quantitatives Taqman réalisées par le laboratoire SCANELIS sur les ADN des écouillons vaginaux réalisées sur les chiennes et nombre de copies virales détectées sur les échantillons positifs	158
Tableau XLI : Résultats des PCR quantitatives Taqman réalisées par le laboratoire SCANELIS sur les ADN des écouillons préputiaux réalisés sur les mâles	160
Tableau XLII : Résultats des PCR quantitatives Taqman réalisées par le laboratoire SCANELIS sur les ADN des spermés totaux prélevés sur 18 mâles et estimation quantitative du nombre de copies virales	161
Tableau XLIII : Résultats des sérologies CHV réalisées par un prestataire extérieur	162
Tableau XLIV : Titres en anticorps anti-CHV chez les animaux testés provenant du même élevage que la femelle F-023.....	171
Tableau XLV : Titres en anticorps anti-CHV chez les animaux testés provenant du même élevage que la femelle F-068.....	175

TABLE DES ABBREVIATIONS ET DES SIGLES

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	AcideRiboNucléique messenger
BID	Deux fois par jour
BoHV-1, BHV-1	Alphaherpèsvirus bovin de type 1
BoHV-5	Alphaherpèsvirus bovin de type 5
CERVO	Comité d'Ethique pour la Recherche clinique et épidémiologique Vétérinaire d'Oniris
CHV, CHV-1	Alphaherpèsvirus canin de type 1
CpHV-1	Alphaherpèsvirus caprin de type 1
Cq	Cycle seuil, cycle de quantification
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin
EDTA	Acide EthylèneDiamineTétraacétique
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EHV-1	Alphaherpèsvirus équin de type 1
EHV-3	Alphaherpèsvirus bovin de type 3
EHV-4	Alphaherpèsvirus bovin de type 4
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FeHV-1, FHV-1	Alphaherpèsvirus félin de type 1
FSH	Hormone de Stimulation Folliculaire
gB, gC, gD	Glycoprotéines B, C, D
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires, Gonadolibérine
gp	Glycoprotéine
HHV-3	Alphaherpèsvirus humain de type 3
HIS	Hybridation In Situ
Hm-Lu1	Hamster Lung 1
HS	Héparane-Sulfate
HSV-1	Herpes Simplex 1

HSV-2	Herpes Simplex 2
HVEM	Herpesvirus Entry Mediator
IA	Insémination Artificielle
IDE	Insulin-Degrading Enzyme
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte
IO	Intra-oral
IP	Intrapéritonéal
IPMA	Test à l'immunopéroxydase en monocouche
kpb	Kilopaire de base
LH	Hormone Lutéinisante
MAG	Myelin-Associated Glycoprotein
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MHC-I	Major Histocompatibility Complex Class I
MHV	Herpesvirus de la maladie de Marek
MPRci	Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor
NMMHC-IIA	NonMuscle Myosin Heavy Chain IIA
NMMHC-IIB	NonMuscle Myosin Heavy Chain IIB
pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PGF2 α	Prostaglandine F2 α
PhHV-1	Alphaherpèsvirus phocin de type 1
PILR α	Paired immunoglobulin like type 2 receptor alpha
PKC	Porcine Kidney Cells
PO	Per Os
PVR	PolioVirus Receptor
qPCR	PCR quantitative
RCP	Résumé des Caractéristiques du Produit
RK13	Rabbit Kidney 13
RNA, ARN	Acid RiboNucléique

RT-Q-PCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
SuHV-1, PRV	Alphaherpèsvirus porcin de type 1
SVV	Simian Varicella Virus
TCID50	50% Tissue Culture Infectious Dose
Tk	Thymidine kinase
TLR	Toll-Like Receptor
TRV	Virus de la rhinotrachéite de la dinde
VgB, VgC, VgD	Glycoprotéines virales B, C, D
VVZ	Virus varicelle-zona
ZP	Zone Pellucide

INTRODUCTION

L'herpèsvirus canin de type 1 (CHV-1, CHV) est un virus à ADN bicaténaire enveloppé, faisant partie de l'ordre des *Herpesvirales*, récemment découvert (en 1965).

Il est rarement responsable de formes cliniques chez les chiens adultes, bien que des atteintes oculaires, respiratoires et génitales soient possibles, notamment à la faveur d'une immunodépression. Chez le chiot de moins de trois semaines, le virus est responsable d'une atteinte multi-systémique le plus souvent fatale. Il est également à l'origine de troubles de la reproduction comme des avortements chez les adultes. Ceci fait donc du CHV un fléau pour les élevages touchés. La pathogénie du CHV est relativement bien connue. Les animaux peuvent se contaminer par voie oro-nasale à la faveur d'un contact avec un animal contaminé, ou par voie vénérienne, lors d'accouplements. Cette dernière n'est pas totalement élucidée. Le sperme est décrit comme une matière virulente, sans qu'aucune étude ne mette formellement en évidence la présence du CHV dans le sperme de chien. Enfin, une autre voie, la voie transplacentaire, est décrite et est responsable de la contamination des fœtus lors de la gestation par une mère infectée par l'herpèsvirus canin.

Ce virus, comme d'autres herpès, est capable de rentrer en latence. Ainsi, un animal peut être porteur mais ne pas l'excréter en permanence, ce qui rend sa détection compliquée à un instant T. Ce virus est responsable de pertes considérables en élevage ayant un impact psychologique et financier important chez les éleveurs concernés. La reproduction faisant partie intégrante des élevages canins, que ce soit par saillie naturelle ou par insémination artificielle, nous avons décidé de nous intéresser à la transmission vénérienne de ce virus.

Après des rappels généraux sur la reproduction dans l'espèce canine et une étude approfondie des connaissances actuelles sur le CHV, nous nous pencherons sur la détection du virus chez des reproducteurs. Pour cela, nous étudierons le risque de transmission vénérienne du CHV en testant divers échantillons à l'aide d'un nouvel outil PCR en temps-réel utilisant la technologie EvaGreen®, préalablement comparé à des tests de références et publiés. Nous tenterons également d'apprécier la circulation de ce virus par sérologie. Enfin, nous discuterons des conduites à tenir et des questions en suspens.

PREMIERE PARTIE : RAPPELS ET GENERALITES SUR LA
REPRODUCTION CANINE

1.1. Rappels de physiologie sexuelle

1.1.1. Puberté chez la chienne

1.1.1.1. Définition

La puberté chez la chienne peut être définie comme étant la période marquée par le développement de caractères sexuels secondaires et par la maturation des organes génitaux permettant la reproduction sexuée (Gobello 2014). Cette période est atteinte en moyenne à l'âge de 6-7 mois (Chastant-Maillard et *al.*, 2014) mais peut en pratique s'étendre de 6 à 14 mois pour la majorité des chiennes (England 2010) voire d'avantage chez les grandes races.

1.1.1.2. Déclenchement de la puberté et implications hormonales chez la chienne

Le déclenchement de la puberté est directement dépendant de la sécrétion ovarienne d'œstradiol (Day et *al.*, 1984) (Ebling et *al.*, 1990). Avant la puberté, le seuil d'œstrogènes sanguins nécessaire pour stimuler la sécrétion de GnRH (gonadolibérine) et donc déclencher la puberté n'est pas atteint (Figure 1, A). La faible concentration sanguine en œstrogènes a alors un effet inhibiteur sur le système nerveux central, au niveau de l'hypothalamus. La GnRH est donc sécrétée en quantité insuffisante, impliquant une non sécrétion de LH (hormone lutéinisante), empêchant le déclenchement de l'activité ovarienne. A l'approche de la puberté, le centre inhibiteur de la stimulation des noyaux à GnRH devient moins sensible au rétrocontrôle négatif de la faible concentration en œstrogènes, ce qui diminue progressivement leur effet inhibiteur (Figure 1, B). Au contraire, au moment de la puberté, cette sécrétion en œstrogènes devient suffisante pour stimuler la sécrétion de GnRH et donc indirectement celle de la LH. Il y a alors activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La fréquence pulsatile de la GnRH augmente de même que la sécrétion en LH et en FSH (Figure 1, C). L'augmentation de cette dernière permet la stimulation du développement folliculaire et une sécrétion d'œstrogènes par les ovaires. Une fois la concentration sanguine de cette dernière assez élevée, le centre phasique hypothalamique est stimulé ce qui permet une sécrétion pulsatile de GnRH et donc de LH (Figure 1, D). Le facteur déclencheur de la puberté serait donc la perte du rétrocontrôle négatif initial des œstrogènes sur l'hypothalamus (Lea

et *al.*, 2019). Le mécanisme réduisant la sensibilité de l'hypothalamus au rétrocontrôle négatif des œstrogènes n'est pas encore élucidé (Vaissaire 1977).

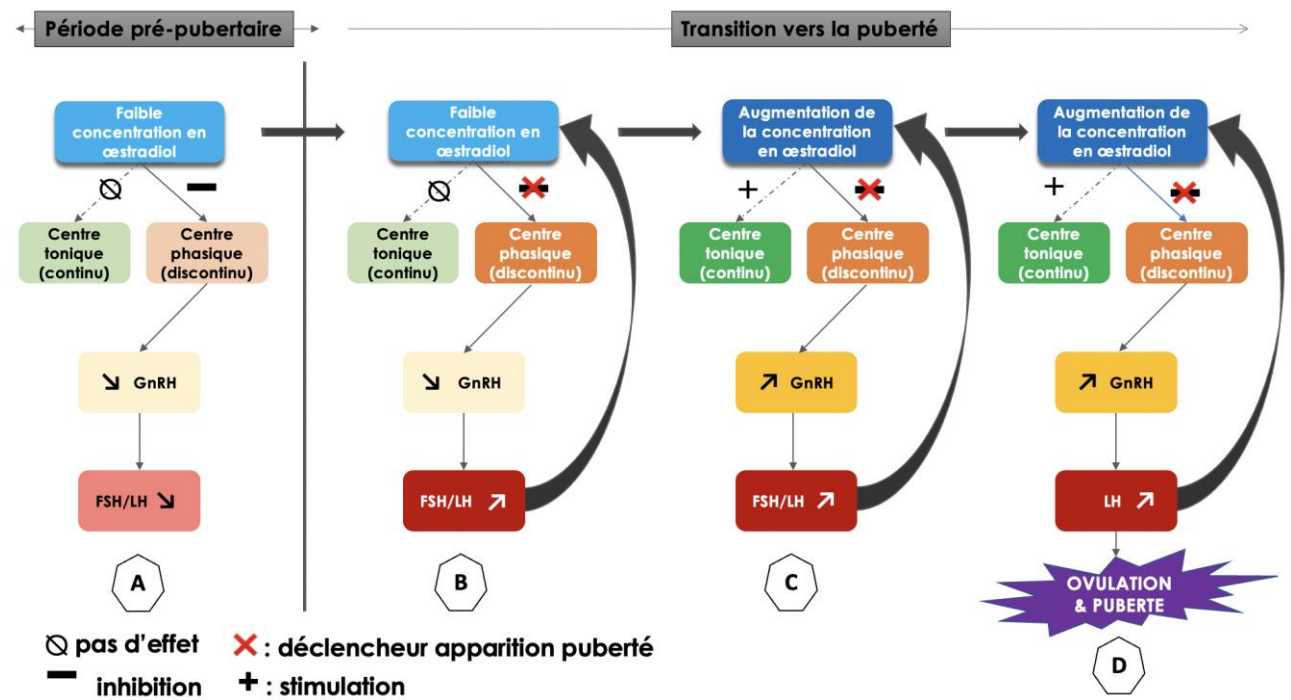


Figure 1 : Régulation hormonale et déclenchement de la puberté chez la chienne (d'après Lea et *al.*, 2019)

1.1.1.3. Facteurs influençant la survenue de la puberté chez la chienne

Plusieurs facteurs influencent l'âge auquel la puberté est atteinte. La race y est pour beaucoup. Les animaux de races grandes et géantes ont tendance à atteindre la puberté plus tardivement (England 2010). Par exemple, un Berger Allemand atteint la puberté en moyenne à 17 mois (Mutembei et *al.*, 2000) tandis que des races de plus petit gabarit, comme les Beagles, peuvent l'atteindre à moins d'un an (Yang et *al.*, 2018) L'état corporel de l'animal entre aussi en jeu. Un animal dénutri verra sa puberté repoussée mais cette dernière finira tout de même par se produire, sauf en cas de dénutrition extrême (Lea et *al.*, 2019). De même, des maladies intercurrentes débilitantes peuvent retarder la puberté. A ce jour, aucune étude ne met en évidence, chez la chienne, un effet de la saison ou de la proximité d'un mâle sur le déclenchement de la puberté.

1.1.2. Saisonnalité du cycle chez la chienne

L'espèce canine est caractérisée par une reproduction non saisonnée. Son cycle est dit mono-œstrien polyovulatoire et son ovulation est spontanée. La chienne ne présente donc qu'un seul œstrus par cycle durant lequel plusieurs ovulations, non dépendantes du coït sont possibles. Il est cependant important de préciser que quelques rares exceptions sont possibles. Le Basenji est l'une des seules races de chien, aujourd'hui, à présenter une reproduction saisonnée, donc dépendante de la photopériode, avec un œstrus en automne (Johannes 2003) (Concannon 2009).

1.1.3. Le cycle sexuel de la chienne

La durée moyenne du cycle d'une chienne est de 7 mois, bien que des variations allant de 5 à 12 mois existent selon les races (Concannon 2011). Le cycle œstral est décomposé en 4 phases distinctes : le proœstrus, l'œstrus, le métœstrus et l'anœstrus.

1.1.3.1. Le proœstrus

Le proœstrus marque l'imprégnation œstrogénique. Des signes cliniques francs sont visibles : gonflement et congestion vulvaires, pertes vaginales sanguinolentes. La femelle attire le mâle mais n'accepte pas l'accouplement durant cette période (Concannon 2011). Le proœstrus dure en moyenne 3 à 21 jours (Concannon et *al.*, 1989) et est caractérisé par un passage de 5pg/mL d'œstradiol sanguin à 40-90 pg/mL (Concannon 2009). Cette augmentation en œstradiol plasmatique entraîne des modifications cytologiques vaginales caractérisées par une augmentation et une prédominance des cellules épithéliales intermédiaires (Figure 2) (Gogny et *al.*, 2010) qui sont majoritairement des cellules parabasales en début du pro-œstrus. D'un point de vue hormonal, cette période est aussi marquée par une augmentation de la sécrétion pulsatile ovarienne de LH causée par une augmentation de la pulsativité de la GnRH (Concannon 1993).

1.1.3.2. L'œstrus

L'œstrus marque la période d'acceptation du mâle par la chienne. Les pertes sanguines se font rares et la vulve est moins congestionnée que durant le proestrus (Lea et *al.*, 2019). Cette phase dure 5 à 15 jours selon les individus (Evans 1931). D'un point de vue hormonal, l'œstrus débute en accord avec la phase de déclin de l'œstradiol, 1 à 3 jours après son pic. Il commence généralement 0 à 1 jour après le pic de LH. C'est durant l'œstrus que l'ovulation se produit, 48 à 60 h après ce pic. Contrairement à d'autres espèces, c'est un ovocyte en phase primaire qui est ovulé. Il ne deviendra secondaire qu'au bout de 96 à 108 h (Concannon 2011). Au niveau de la cytologie vaginale, on retrouve alors en majorité des cellules kératinisées (Figure 2) (Gogny et *al.*, 2010) qui sont des cellules superficielles.

1.1.3.3. Le métœstrus

Le métœstrus est la période à partir de laquelle la chienne n'accepte plus le mâle. Des débats existent sur sa durée mais il dure en moyenne 50 à 80 jours (Concannon 2011). Certains considèrent que cette période se termine par la régression des corps jaune vers 70 jours, tandis que d'autres considèrent qu'elle s'achève au terme de la réparation de l'endomètre, vers 140 jours (Robinson et *al.*, 2019). Des travaux récents tendent à dire que cette durée peut être supérieure à 140 jours en fonction du taux de progestérone sanguine retenu (Nio 2013) (Galodé 2014). Durant cette période, le taux de progestérone est élevé (sécrétion par les corps jaunes formés en post ovulation). Il a été démontré que ce taux peut atteindre une valeur moyenne maximale d'environ 20 ng/ml, 4-8 jours après le début du métœstrus (Christie et *al.*, 1971). Cytologiquement, les frottis vaginaux sont caractérisés par : des cellules parabasales, des cellules intermédiaires, des polynucléaires neutrophiles et quelques kératinocytes (Figure 2) (Gogny et *al.*, 2010).

1.1.3.4. L'anœstrus

L'anœstrus débute à la fin de la phase lutéale, mais son apparition exacte dépend des critères utilisés pour définir la fin de cette phase. On peut considérer que la fin de la phase lutéale correspond au moment où la concentration plasmatique en progestérone atteint pour la première fois un niveau inférieur à 1 ng/mL (Okkens et *al.*, 2006). La durée de l'anœstrus varie

considérablement d'une chienne à l'autre mais sa durée s'étend de 80 à 240 jours (Concannon 2011) et dépend du taux de progestérone chez un individu donné. Cytologiquement, au niveau des cellules vaginales, nous retrouvons uniquement des cellules parabasales (Figure 2) (Gogny et *al.*, 2010) et ce en quantité faible.

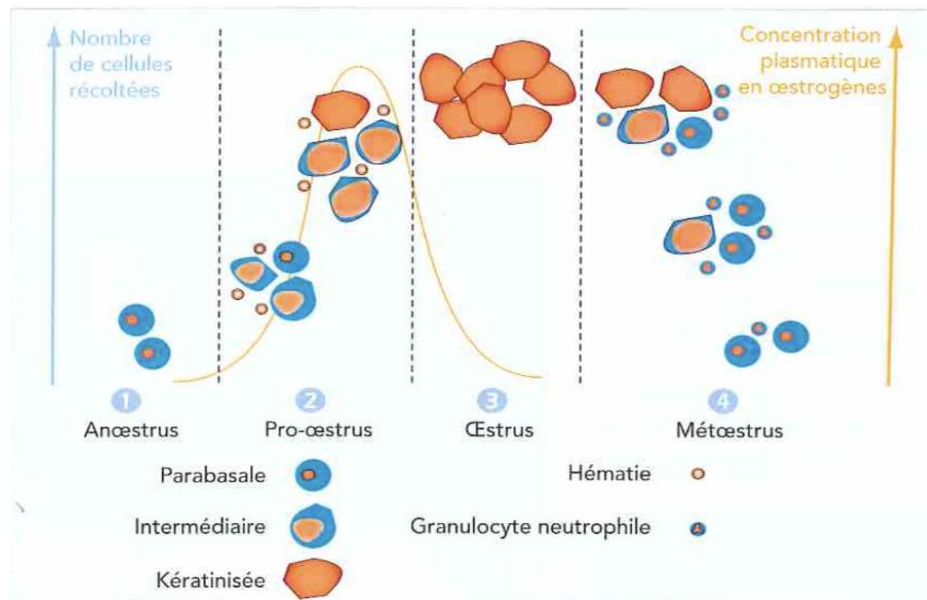


Figure 2 : Évolution de la population cellulaire vaginale au cours du cycle œstral de la chienne (Gogny et *al.*, 2010)

1.1.4. La gestation

La durée de gestation chez la chienne est comprise entre 52 et 74 jours post accouplement. Cette variation est attribuée à la variabilité individuelle de la durée du pro-oestrus dans l'espèce canine (Lamm et *al.*, 2012). Des études tendent à dire que la durée de gestation peut être déterminée de manière plus précise si l'on se base sur le pic de LH. En effet, en moyenne, les chiennes mettent bas 64 à 66 jours après ce pic (Root Kustritz 2005). De plus, le délai entre la fécondation et la mise-bas est de 61 jours en moyenne (Pretzer 2008). La gestation est maintenue tant que des niveaux suffisants en progestérone sont présents. En effet, il a été démontré que l'injection d'un compétiteur aux récepteurs de la progestérone, la mifépristone, induit un avortement (Concannon et *al.*, 1990) et qu'une ovariectomie en cours de gestation, peu importe le stade, induit un avortement ou une résorption embryonnaire (Sokolowski 1971). Ainsi, la principale source de progestérone, est le corps jaune ovarien, qui est indispensable pour qu'une gestation puisse se dérouler chez la chienne.

Une fois la fécondation réalisée, le développement prénatal se déroule en 3 phases distinctes dans le temps : la phase embryoblastique, la phase embryonnaire et enfin la phase fœtale.

1.1.4.1. La phase embryoblastique

Cette période se déroule de J12 à J17 (J0 étant le pic de LH) (Pretzer 2008). Le zygote entre en division post fécondation et se retrouve dans la cavité utérine, sous forme d'une morula de 16 à 32 cellules, grâce au péristaltisme utérin (Taverne et *al.*, 2019). Cet événement se déroule en moyenne à J11. Les divisions se poursuivent et aboutissent à la formation d'un blastocyste vers J14 (Abe et *al.*, 2008).

A l'intérieur de celui-ci se trouve un embryoblaste (bouton embryonnaire et trophoblaste) accompagné d'une cavité appelée le blastocœle (Pretzer 2008). S'en suit la perte de la zone pellucide permettant l'obtention d'un blastocyste libre jusqu'à son implantation endométriale entre J17 et J19 (Pretzer 2008).

1.1.4.2. La phase embryonnaire et placentation

Une fois l'implantation effectuée, la phase dite embryonnaire débute. Elle est caractérisée par une étape dite de gastrulation durant laquelle 3 feuillets, qui donneront les futurs tissus du conceptus, apparaissent. Ce sont : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Parallèlement, un tube digestif au stade primitif se forme. La différenciation de ces différents feuillets aboutit à l'ébauche des divers organes de l'embryon : c'est ce qu'on appelle l'organogenèse (Pretzer 2008). Parallèlement, lors de cette phase embryonnaire, la placentation se met en place. Le placenta permet, entre autres, la protection du conceptus, les échanges de nutriments avec la mère et l'élimination des déchets. Chez la chienne, elle est zonaire et mesure, selon les espaces, entre 2,5 et 7,5 cm de largeur. Ce placenta est divisé en 2 entités : une partie maternelle, l'endomètre et une partie fœtale, le chorion allantoïdien. La placentation dans l'espèce canine est dite endothéliochoriale c'est-à-dire constituée de 4 couches : l'endothélium du fœtus, son mésenchyme, le chorion et l'endothélium maternel. Ce type de placentation ne permet le passage que de 5 à 10 % des immunoglobulines maternelles ce qui rend primordiale la prise de colostrum à la naissance (Johnston et *al.*, 2001). La placentation aboutit donc à la formation de l'amnios, empli de liquide amniotique et enveloppant le fœtus. Ce liquide protège le fœtus des chocs externes et est constitué de ses sécrétions buccales, respiratoires

ainsi que de ses urines. L'allantoïde, dont la partie externe est fusionnée avec le chorion, contient une couche interne qui elle, est fixée à l'amnios. Les 2 couches délimitent ce qu'on appelle la cavité allantoïdienne (Reece 2009).

1.1.4.3. La période foétale

Cette période s'étend de J35 jusqu'à la mise-bas. Elle débute alors que l'organogenèse est complète. Cette phase se caractérise par le développement de caractères externes tels que la croissance des pavillons externes auriculaires, du tronc, des poils et des griffes ainsi que la fermeture des paupières et l'apparition de la pigmentation du fœtus. Elle est aussi caractérisée par la différenciation sexuelle du conceptus et l'amorçage de la descente testiculaire chez le mâle qui prendra fin après la naissance (Pretzer 2008).

1.1.5. La parturition chez la chienne

1.1.5.1. Les signes cliniques associés à la parturition

Quelques jours avant la parturition, les mamelles de la chienne augmentent de taille. De même, un gonflement vulvaire et un écoulement de mucus sont observables (le bouchon muqueux obstruit l'orifice externe du col lors de la gestation). Un relâchement de la ceinture musculaire abdominale est également visible. Six à 8 heures avant la parturition, la température corporelle de la chienne gestante peut diminuer, jusqu'à 1°C avant le l'accouchement : c'est le signe Liebenberger. A l'approche du part, des modifications comportementales peuvent être remarquées. Une agitation, l'élaboration d'un nid ou des mictions fréquentes ne sont pas rares (Reece 2009).

1.1.5.2. Les stades de la parturition

De manière générale, la parturition peut être divisée en 3 stades. Le premier correspond à l'apparition de contractions utérines, 6 à 12 heures avant le part et à l'amorce de la dilation du col utérin. Le second stade correspond à la dilatation maximale de ce dernier et au passage dans le canal pelvien des fœtus (Lamm et *al.*, 2012). Enfin, le troisième et dernier stade correspond à

l'expulsion des enveloppes fœtales 5 à 15 minutes après l'expulsion fœtale, si cela ne s'est pas déroulé en même temps (Johnston et *al.*, 2001).

1.1.5.3. Les modifications hormonales et chimiques associées à la parturition

(Figure 3)

A l'approche de la parturition, la maturité du fœtus augmente. Ce phénomène est accompagné par une augmentation de la production de cortisol par les surrénales fœtales.

Cette augmentation en corticoïdes induit une augmentation de la production en œstrogènes par l'unité foeto-placentaire, quelques semaines avant le part. Celle-ci contribue à plusieurs phénomènes. Tout d'abord, elle permet la stimulation de la synthèse de protéines contractiles dans le myomètre notamment et stimule l'apparition des récepteurs à l'ocytocine sur l'utérus. De plus, l'augmentation en œstrogènes favoriserait la synthèse de prostaglandines PGF2 α (Reece 2009). Ces dernières ont un effet lutéolytique sur le corps jaune ovarien ce qui provoque une chute de la progestérone (indispensable au maintien de la gestation). Par conséquent, la concentration plasmatique en progestérone passe de 4-10 ng/mL à 2 ng/mL et ce en 12 à 24 heures, 1 à 2 jours *pre-partum* (Verstegen-Onclin et *al.*, 2008). L'augmentation contemporaine du taux d'œstrogènes et la diminution du taux de progestérone font passer l'utérus d'un état de quiescence à un état de contractilité potentielle, se traduisant notamment par une augmentation de la sensibilité de l'utérus à l'ocytocine (Reece 2009). L'augmentation de la concentration sérique de relaxine à l'approche de la parturition entraîne un relâchement et une distension accrue du col de l'utérus, du vagin et de la vulve, ce qui facilite le part (Johnston et *al.*, 2001). Le fœtus est alors enfin engagé dans la filière pelvienne. L'action mécanique de ses membres contre la paroi utérine augmente la concentration en ocytocine, augmentant alors les contractions utérines et permettant l'expulsion fœtale (Reece 2009). De plus, lors du passage du fœtus au travers de la filière pelvienne lorsque celui-ci appuie sur les lombes et le sacrum, le réflexe de Ferguson se déclenche et entraîne une décharge supplémentaire d'ocytocine.

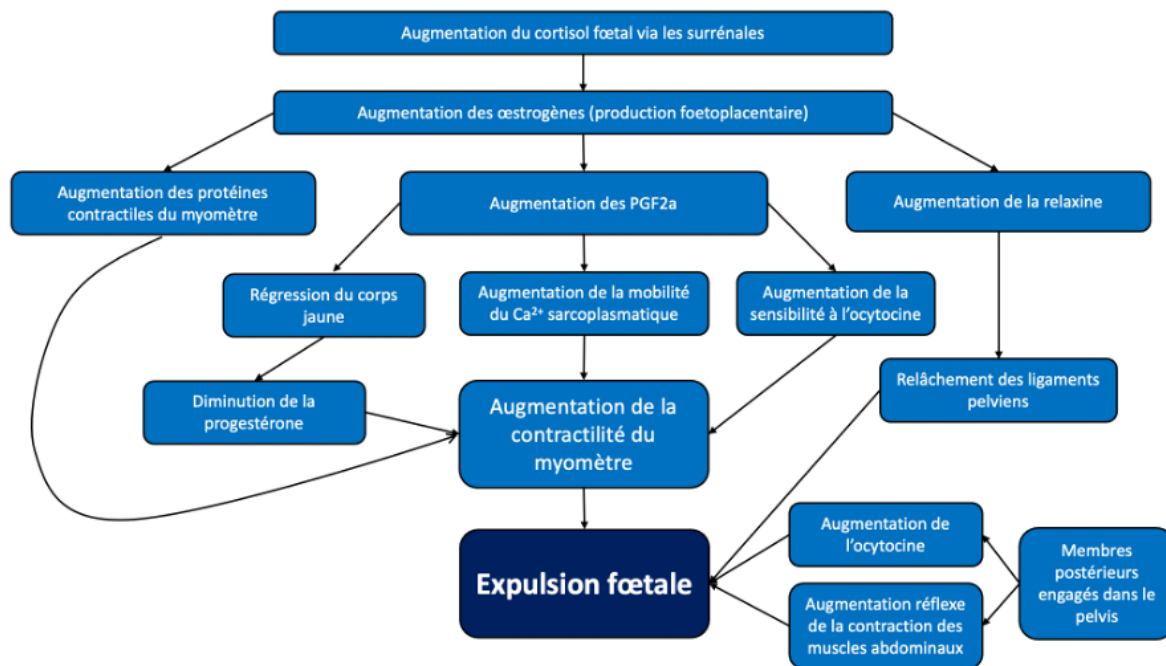


Figure 3 : Événements correspondant au début de la parturition chez la chienne et débutant par la sécrétion fœtale de cortisol (d'après Reece 2009)

1.1.6. Le post-partum

1.1.6.1. Chez la chienne

Une fois la parturition achevée, la chienne débute sa lactation. Cette production lactée est d'abord caractérisée par la production de colostrum, riche en immunoglobulines maternelles, en nutriments et en diverses vitamines. La concentration en immunoglobulines chute rapidement dans le temps. On considère que la production de lait débute au deuxième jour de lactation (Reece 2009). Le sevrage du chiot par la mère est progressif et se déroule entre la 7^{ème} et la 10^{ème} semaine de lactation et dépend en partie du caractère plus ou moins maternel de la mère. (Loubière 2010). La période *post-partum* est aussi synonyme d'involution utérine. Immédiatement après le part, des pertes verdâtres dont la couleur est due à l'utéroverdine, appelées lochies, sont remarquables au niveau de la vulve. Ces pertes changent rapidement d'aspect et deviennent sanguinolentes puis mucoïdes dans les 12 jours suivant le part (Noakes 2019). Il n'est cependant pas inhabituel de constater des pertes vulvaires sanguines dans les mois suivant la mise-bas. Elles correspondent à la subinvolution des zones endométriales d'insertion du placenta (Beck et *al.*, 1966). De plus, chez la chienne, les cornes utérines retrouvent leur taille pré-gravidique 4 semaines *post-partum*.

1.1.6.2. Chez le chiot

Lors du part, l'allantoïde est rompue mais l'amnios reste autour du chiot qui naît généralement recouvert de cette membrane. Lors d'un part naturel, la chienne lèche vigoureusement le chiot afin de retirer cette membrane et de stimuler les fonctions cardiorespiratoires de l'animal. Elle sectionne généralement le cordon ombilical à l'aide de ses dents (Johnston et *al.*, 2001). Une fois né, un chiot a une température corporelle très inférieure à celle de l'adulte, qui avoisine les 35°C. Elle augmente progressivement au cours des semaines, pour atteindre les 38°C à environ 1 mois après la naissance (Rickard 2011). L'incapacité des chiots à se thermoréguler les rend très sensibles aux variations de températures dans les premières semaines de vie. Les chiots sont également vulnérables vis-à-vis des agents pathogènes présents dans l'environnement. La présence d'une placentation endothéliochoriale de type zonaire implique que seulement 5 à 10% des immunoglobulines maternelles parviennent au chiot durant la gestation (Johnston et *al.*, 2001). C'est pour cela que la prise de colostrum dans les quelques heures suivant le part est importante dans l'espèce canine. Cependant, l'absorption intestinale d'immunoglobulines maternelles ne peut se dérouler que dans une fenêtre très réduite de temps. Seules 40% des immunoglobulines G peuvent être absorbées à la naissance et ce pourcentage est divisé par 2 dans les 4 heures qui suivent le part. De manière globale, le tube digestif des chiots n'est plus en capacité d'absorber des immunoglobulines environ 16h après la naissance (Chastant-Maillard et *al.*, 2012).

1.1.7. Puberté chez le chien

1.1.7.1. Définition

Aucune définition stricte de la puberté n'existe pour le chien mâle. Elle peut être décrite comme la période de la vie de l'animal à laquelle la première éjaculation a lieu ou la période durant laquelle les premiers comportements sexuels apparaissent. D'autres considèrent que cette période est caractérisée par l'acquisition de la capacité à produire un éjaculat correct en termes de qualité et de quantité de spermatozoïdes (Lea et *al.*, 2019). Elle est parfois aussi considérée comme la période à laquelle la spermatogenèse débute (Lee et *al.*, 2017).

1.1.7.2. Déclenchement de la puberté et implications hormonales chez le chien

Avant la puberté, l'hypothalamus du chien est très sensible au rétrocontrôle négatif exercé par les hormones que sont la testostérone et l'œstradiol sur les neurones à GnRH (Figure 4, A). A l'approche de la puberté, ce rétrocontrôle diminue et une sécrétion pulsatile de GnRH par les neurones à GnRH hypothalamiques se met en place. Cette dernière permet la stimulation de la sécrétion de LH et de FSH au niveau testiculaire ce qui amorce la spermatogenèse et donc la puberté (Figure 4, B) (Lea et *al.*, 2019). Il est supposé que l'augmentation de LH avant la puberté chez le mâle débiterait avant celle de la femelle. Ceci permettrait une augmentation progressive de la production de testostérone chez les mâles. Ce processus expliquerait que ces derniers atteignent la puberté avant les femelles (Foster et *al.*, 2006).

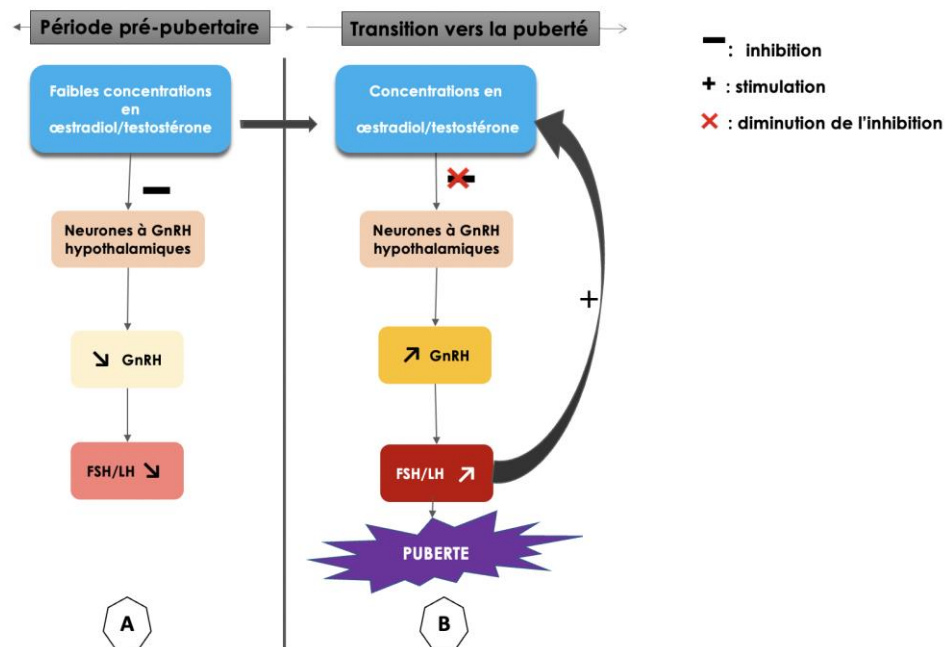


Figure 4 : Déclenchement de la puberté chez le chien (d'après Lea et *al.*, 2019)

1.1.8. La spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus biologique permettant la formation de spermatozoïdes. Elle peut être découpée en 3 phases distinctes : la spermatocytogenèse qui correspond à la formation des spermatides à partir de cellules appelées spermatogonies et la spermiogenèse, qui correspond à la différenciation de ces spermatides en gamètes mâles, les spermatozoïdes (Johnston et *al.*, 2001). Une troisième et dernière phase vient compléter le processus de spermatogenèse : la

spermiation, qui correspond à la libération des spermatides matures dans la lumière des tubes séminifères, avant leur passage dans l'épididyme. La fonction principale des spermatozoïdes est la fécondation du gamète femelle (Chłopik et *al.*, 2019). La durée totale de la spermatogenèse est d'environ 60 jours chez les mammifères (Parkinson 2019). Elle dure en moyenne 61,9 jours, pour le Caniche, le Pinscher, le Beagle et le Labrador (Soares et *al.*, 2009).

1.1.8.1. La spermatocytogenèse

Cette première étape se déroule au niveau de la membrane basale des tubes séminifères des testicules où se trouvent des spermatogonies (cellules souches diploïdes). Elles vont tout d'abord subir une étape de multiplication par mitoses. Lors de la mitose d'une spermatogonie, une nouvelle cellule remplace la cellule qui vient de se diviser. Via cette étape, des spermatocytes primaires (diploïdes) sont formés. Ces derniers vont alors entrer en première division de méiose aboutissant à la formation de spermatocytes secondaires, haploïdes, qui subiront à leur tour la deuxième étape de division de méiose permettant la formation de spermatides haploïdes (Chłopik et *al.*, 2019) (Reece 2009).

1.1.8.2. La spermiogenèse

Une fois la formation des spermatides via la spermatocytogenèse réalisée, une nouvelle étape, la spermiogenèse, débute. Plusieurs événements de transformation de la spermatide se déroulent de manière concomitante. On peut observer une phase de condensation de la chromatine nucléaire (Monesi 1971). Parallèlement, des vésicules contenant majoritairement des enzymes indispensables de l'acrosome sont synthétisées avant de fusionner. Cette fusion se fait au niveau de la base du noyau du futur spermatozoïde qui se déplace du centre de la cellule vers une marge membranaire (Parkinson 2019). Se déroulent ensuite l'allongement de la spermatide, la formation de la tête et de la queue du futur spermatozoïde grâce à, entre autres, la mise en place d'un système impliquant des microtubules et des filaments d'actine (Lehti et *al.*, 2016). A la fin de cette phase de spermiogenèse sont obtenus des spermatides matures.

1.1.8.3. La spermiation (O'Donnell et al., 2011)

La spermiation est l'étape durant laquelle les spermatides matures obtenus à la fin de la spermiogenèse sont libérés dans la lumière des tubes séminifères par les cellules de Sertoli. Ces dernières phagocytent le cytoplasme résiduel du futur spermatozoïde avant la libération des gamètes.

1.2. MODES DE REPRODUCTION DANS L'ESPECE CANINE

1.2.1. L'accouplement naturel

1.2.1.1. La saillie

Chez le femelle, des émissions fréquentes d'urines, un déplacement latéral de la queue exposant la vulve ou encore une augmentation de la fréquence des contacts physiques avec ses congénères sont observés. La chienne peut également s'immobiliser devant le mâle qui devient excité. La saillie a alors lieu. En présence du mâle, la femelle se met en position de lordose.

1.2.1.2. L'érection

Chez le mâle, l'érection est définie comme une augmentation de la turgescence pénienne. Le pénis est constitué d'un urètre, entouré d'un corps spongieux qui prend racine au niveau du bulbe pénien et qui se termine au niveau du gland. Ce corps spongieux est lui-même entouré des corps caverneux, qui naissent au niveau des racines du pénis (Parkinson 2019). L'artère pudendale est responsable de la vascularisation du pénis. C'est une ramification de l'artère fémorale commune (Gaye et al., 2016). Le sang veineux quitte le corps caverneux via les racines du pénis à travers la veine pudendale tandis que le corps spongieux est drainé via la veine dorsale superficielle du pénis (Ashdown et al., 1974).

1.2.1.2.1. L'intromission

La saillie est le terme utilisé pour décrire l'accouplement durant lequel le mâle introduit son pénis en érection dans le vagin de la chienne jusqu'à l'éjaculation. L'étape de la saillie, durant laquelle le pénis pénètre dans le vagin, est appelée l'intromission. Après cette intromission, la distension pénienne du chien est à son maximum et des mouvements de va-et-vient sont amorcés par le mâle (Reece 2015).

1.2.1.2.2. L'émission

L'émission est l'étape qui précède l'éjaculation à proprement parler. Elle correspond au passage du liquide contenu dans les canaux déférents, dans l'ampoule déférentielle, dans les glandes accessoires (les glandes urétrales et la prostate) et des spermatozoïdes dans l'urètre. Ceci est permis par un péristaltisme sous innervation sympathique (Reece 2015).

1.2.1.2.3. L'éjaculation

Une fois l'émission accomplie, le péristaltisme réflexe des muscles urétraux propulse le contenu de l'urètre vers l'orifice urétral externe. Cette dernière phase, le péristaltisme de l'urètre, est assistée par les contractions rythmiques du muscle bulbospongieux, qui recouvre le corps spongieux dans le bulbe du pénis, et des muscles lisses de l'urètre (Parkinson 2019). La combinaison de la pression et du péristaltisme pousse le sperme de l'urètre vers l'extérieur, ce qui constitue le processus d'éjaculation. Une des singularités de l'espèce canine est la présence d'un os pénien et de bulbes érectiles à la base de la verge. Ces derniers permettent le retournement du mâle par rapport à la femelle tout en bloquant la verge du chien dans le vagin de la chienne. C'est suite à ce retournement que l'éjaculation de la phase spermatique se produit, sur environ une minute. Enfin, la fraction prostatique est émise dans la femelle, ce qui peut durer 10 à 20 minutes. La stimulation de l'émission et de l'éjaculation provient des nerfs sensoriels situés dans le gland du pénis (Reece 2015). L'éjaculation est stimulée par les nerfs sensitifs situés au niveau du gland. Le système sympathique, via le nerf hypogastrique ainsi que le système parasympathique via le nerf honteux contrôlent l'éjaculation (Parkinson 2019).

1.2.1.2.4. La phase post éjaculation

1.2.1.2.4.1. Le trajet des gamètes mâles et leur capacitation

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes sont déposés dans la partie crâniale du vagin de la chienne (England et *al.*, 1998). Une étude montre que, 24h après une insémination artificielle, les spermatozoïdes sont majoritairement retrouvés au niveau de la jonction utéro-tubaire et des glandes endométriales utérines (Rijsselaere et *al.*, 2004). Ceci est rendu possible par des contractions vaginales et utérines qui permettent la remontée des spermatozoïdes le long des voies génitales femelles via le col entrouvert pendant l'œstrus (England et *al.*, 2003).

Il a également été démontré que le nombre de glandes utérines et le nombre de spermatozoïdes dans celles-ci est plus élevé lorsque l'accouplement naturel ou l'insémination artificielle sont réalisés au moment de l'ovulation de la chienne (Rijsselaere et *al.*, 2014). La libération d'ocytocine induite par l'accouplement et les prostaglandines contenues dans l'éjaculat accroissent la motilité des spermatozoïdes vers les cornes utérines. Ce transport utérin est également favorisé par la pression négative de cet organe qui permet une « aspiration » des gamètes mâles dans ce dernier (Reece 2009). Chez la chienne, la partie la plus distale de la jonction utéro-tubaire et les glandes de l'utérus servent de réservoir aux spermatozoïdes. (Rijsselaere et *al.*, 2014). Les spermatozoïdes subissent alors des modifications indispensables à la fécondation ultérieure de l'ovocyte, notamment via la pénétration de la zone pellucide entourant le gamète femelle. Cette étape primordiale est la capacitation du spermatozoïde. Durant celle-ci l'acrosome du spermatozoïde subit des changements canaux qui permettront la sortie d'enzymes protéolytiques et de la hyaluronidase, indispensables pour la fécondation (Reece 2015).

1.2.1.2.4.2. La fécondation

La fécondation de l'ovocyte se déroule lorsque l'ovocyte est en métaphase II, dans la partie distale de l'oviducte de la chienne (Tsutsui 1975). Tout d'abord, il y a la pénétration du cumulus oophorus. Ce dernier peut être défini comme un amas de cellules de la granulosa entourant l'ovocyte. Il se densifie en post-ovulation via le dépôt de protéoglycanes et en particulier d'acide hyaluronique (Salustri et *al.*, 1999). Une fois ce cumulus franchi, le spermatozoïde capacité se fixe à la zone pellucide de l'ovocyte. Cette dernière est constituée d'un ensemble de glycoprotéines extracellulaires entourant notamment l'ovocyte. Elle contient des glycoprotéines majeures (ZP1, ZP2 et ZP3) qui reconnaissent et se lient à des récepteurs présents sur les spermatozoïdes capacités (Zhao et *al.*, 2002). La fixation d'un récepteur du spermatozoïde à la protéine ZP3 permet le déclenchement de la réaction acrosomique. L'acrosome est une structure qui recouvre la partie antérieure du noyau du spermatozoïde et qui contient un grand nombre d'enzymes hydrolysantes puissantes (Tulsiani et *al.*, 1998). La libération de ces enzymes permet la fusion des membranes des 2 gamètes et la formation d'un zygote.

1.2.2. L'insémination artificielle (Mason 2018)

1.2.2.1. Prérequis à l'insémination artificielle

1.2.2.1.1. Collecte du sperme, évaluation et conservation

Le sperme est récupéré manuellement par un opérateur. Pour cela, il est primordial que la rétraction du prépuce sur les bulbes soit réalisée avant l'érection du mâle, afin d'imiter au mieux l'accouplement naturel (Grandage 1972). Pour optimiser l'opération, le prélèvement doit se faire sans douleur et en présence d'une chienne en œstrus afin de stimuler le mâle.

La collecte du sperme peut se faire via des vagins artificiels en latex à l'extrémité desquels des tubes, permettant de collecter la semence, sont placés. Cela peut se faire également via des entonnoirs ou encore des tubes en plastique. Le sperme du chien peut être divisé en 3 fractions, éjaculées de manière consécutive dans l'ordre qui suit : la fraction urétrale, la fraction spermatique et enfin, la fraction prostatique. La première fraction est récoltée rapidement dès lors que le chien atteint

l'érection. Elle n'est généralement pas conservée car elle contient des bactéries et peu de spermatozoïdes. La seconde fraction est éjaculée et récupérée dans un nouveau tube quand les mouvements de va-et-vient du chien cessent. Une fois que le liquide collecté commence à s'éclaircir, un nouveau tube est utilisé pour récolter la dernière fraction (Farstad 2010).

L'appréciation de la qualité du sperme collecté repose sur l'évaluation de la motilité massale et de la morphologie des spermatozoïdes ainsi que leur nombre. Elle se fait via un examen microscopique. La femelle doit être inséminée avec du sperme frais dans les 30 minutes après la collecte. Si on travaille avec du sperme réfrigéré à +4°C, ce dernier peut être conservé jusqu'à 2 jours avant l'insémination, s'il est de bonne qualité (Thomassen et *al.*, 2009). Certains centres ou services de reproduction vétérinaires, comme c'est le cas à Oniris, proposent la conservation de sperme de longue durée à -196°C dans de l'azote liquide.

1.2.2.1.2. Détermination du moment optimal d'insémination de la femelle

1.2.2.1.2.1. Dosage de l'hormone lutéinisante (LH)

Chez la chienne, l'ovulation se déroule 36 à 50 h après le pic de LH et l'ovocyte est fécondable 2 à 3 jours après l'ovulation. Le dosage de la LH paraît donc être un moyen de déterminer le moment optimal d'insémination. Cependant, bien que le dosage de la LH, quantitatif ou non, soit réalisable, il est en pratique difficile de déterminer avec précision le moment de l'ovulation chez la chienne. Ce dosage n'est donc pas réalisé en routine (Concannon 2009).

1.2.2.1.2.2. Dosage de la progestérone

Ce dosage peut se réaliser en routine, par chimiluminescence sur du sérum récupéré à partir de sang prélevé moins de 2h avant le dosage. L'ovulation se produit lorsque la concentration en progestérone sérique est supérieure à 10 ng/mL (Jeffcoate et *al.*, 1989) (Volkman 2006). Plus récemment, une nouvelle technique est apparue, adaptée de la médecine humaine : la méthode ELFA (test de fluorescence lié à une enzyme), qui permet, chez la chienne, de doser la progestérone dans le sang périphérique à partir de plasma, de manière rapide et fiable (Brugger et *al.*, 2011).

1.2.2.1.2.3. Cytologie vaginale

La cytologie vaginale est réalisée via la coloration rapide de lames sur lesquelles des cellules vaginales récoltées via l'introduction d'un écouvillon humidifié dans le vagin de la femelle ont été déposées. On peut généralement observer un cytoplasme élargi, une kératinisation des cellules de surface et une pycnose nucléaire ainsi qu'un pourcentage de cellules nucléaires équivalent à 50% des cellules kératinisées au début de l'œstrus. On dit, lors de l'œstrus, que le frottis est d'apparence propre. L'ovulation se produit lorsqu'on a plus de 80% de cellules acidophiles, c'est l'indice éosinophilique.

1.2.2.2. Description et réalisation des différents types d'insémination artificielle disponibles

1.2.2.2.1. Insémination vaginale

Cette technique permet de déposer le sperme frais ou réfrigéré à l'ouverture du col de l'utérus. Elle requiert le passage d'une sonde d'insémination lubrifiée. Pour cela, cette dernière est d'abord insérée à 45 ° par rapport aux lombes de la chienne. Une fois qu'une résistance est rencontrée, la sonde est horizontalisée et poussée jusqu'à la rencontre d'une nouvelle zone de résistance. La fraction spermatique est alors injectée à travers la sonde et poussée avec la fraction prostatique (England et *al.*, 1992). Dans la pratique, pour le sperme frais, comme cela est réalisé au service de Reproduction d'Oniris, on dépose les 3 fractions, urétrale, spermatique et ensuite prostatique dans l'ordre prélevé au niveau vaginal. Une fois la fraction prostatique poussée dans la sonde, cette dernière est « vidée » dans la chienne, par injection d'air. Le train postérieur de la femelle est surélevé pendant 10 minutes lors de l'utilisation d'une sonde classique. Lors d'une utilisation de sonde type « Osiris », dotée d'un ballonnet, ce dernier sera gonflé au fond du vagin avant l'injection des 3 fractions. La sonde sera ensuite laissée en place pendant 10 minutes avec le ballonnet gonflé afin d'étanchéiser la partie antérieure du vagin. Lorsque que l'insémination artificielle est réalisée avec du sperme réfrigéré, seule la fraction spermatique, diluée dans un milieu de réfrigération, est injectée.

1.2.2.2. Insémination transcervicale par endoscopie

Cette technique permet la visualisation du col avec un endoscope. Une fois cette étape réalisée, la sonde seule est poussée dans le corps de l'utérus via le col utérin qui est entrouvert. Le sperme est alors injecté, la sonde retirée (Mason 2017) (Mason et *al.*, 2014).

1.2.2.3. Insémination par cathétérisme norvégien

La sonde norvégienne est constituée d'un cathéter en acier et d'un guide en nylon. Pour réaliser cette insémination, l'opérateur doit palper le col de l'utérus de la chienne par voie transabdominale. Il insert alors le dispositif dans le vagin de la chienne et pousse le cathéter dans le col de l'utérus tout en le maintenant de manière externe. Le sperme est alors injecté dans la lumière de l'utérus (Linde-Forsberg 1991).

1.2.2.4. Insémination intra-utérine par laparotomie

Cette technique d'insémination requiert le dépôt de la semence dans l'utérus d'une chienne subissant une laparotomie sous anesthésie générale. Un cathéter intraveineux est inséré dans l'utérus et la semence directement injectée. Une fois cette étape accomplie, l'utérus est massé afin de faire remonter la semence dans les trompes utérines (Fukushima et *al.*, 2010) (Tsutsui et *al.*, 1989). Cette technique, pouvant être utilisée pour inséminer du sperme frais, réfrigéré ou congelé est peu pratiquée en Europe alors qu'elle est outre-Atlantique.

1.2.2.5. Insémination par laparoscopie

Cette technique est décrite mais très rarement réalisée. Elle consiste en l'introduction d'une aiguille d'insufflation laparoscopique dans la cavité abdominale, sur la ligne blanche de la chienne à inséminer, 1 cm au-dessus de l'ombilic. Un laparoscope, utilisé pour visualiser la cavité abdominale est introduit au niveau de la ligne blanche de l'animal, cette fois-ci 1 cm en dessous de l'ombilic. Une pince, utilisée pour la préhension de l'utérus, est insérée après ponction de 0,5 à 2 ou 3 cm latéralement aux glandes mammaires, à droite ou à gauche. Après insufflation abdominale et

préhension du corps utérin à la pince et rapprochement de ce dernier contre la paroi abdominale, une aiguille de 18g est introduite entre la 3^{ème} et la 5^{ème} paire de mamelles, sur la ligne blanche. La corne utérine est ensuite ponctionnée et 1 mL de sperme frais est injecté (Silva et *al.*, 1995). Toute la difficulté de la manipulation réside dans la correcte ponction de la corne, puisqu'il faut se retrouver dans la lumière de cette dernière. En effet, l'injection peut accidentellement se faire au niveau de la séreuse ou de la musculuse.

DEUXIEME PARTIE : L'HERPESVIROSE CANINE

2.1. L'herpèsvirus canin

2.1.1. Découverte et historique

Le terme « herpès » est évoqué pour la première fois par Hippocrate il y a plus de 2000 ans pour décrire des lésions ulcératives et contagieuses semblant ramper (“herpes” en grec) sur la peau des êtres humains atteints (Roizman et *al.*, 2001). C’est en 1965 que Carmichael et son équipe décrivent un épisode de septicémie affectant des chiots et entraînant leur mort (Carmichael et *al.*, 1965a). La faute est d’abord imputée à des mycoplasmes mais cette même équipe met en évidence, un an plus tard, qu’un inoculum sans mycoplasmes reproduit les mêmes lésions, sur des cultures cellulaires de reins et sur des chiots sains. C’est alors qu’est isolé sur ces cellules un virus présentant les caractéristiques des Herpèsvirus. Une première description au microscope électronique de cet agent viral, l'herpèsvirus canin de type 1 (CHV-1 ou CHV) est réalisée la même année (Strandberg et *al.*, 1965).

2.1.2. Taxonomie

L'herpèsvirus canin de type 1, responsable de la maladie appelée « herpèsvirose canine » est un virus à ADN bicaténaire faisant partie de l’ordre des *Herpesvirales*. Il appartient à la famille des *Herpesviridae*, de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* et au genre *Varicellovirus*, comme de nombreux virus responsables de diverses maladies chez les mammifères (Tableau I).

Tableau I : Liste non exhaustive de *Varicellovirus* touchant divers mammifères ainsi que les maladies provoquées par ceux-ci

Nom du virus	Animaux atteints	Maladies provoquées
Alphaherpèsvirus bovin de type 1 (BoHV-1)	Bovins	Rhinotrachéite infectieuse bovine, conjonctivite, avortement, encéphalite, atteinte néonatale polymorphe digestive et respiratoire... (Marin et <i>al.</i> , 2016)
Alphaherpèsvirus caprin de type 1 (CpHV-1)	Caprins	Atteinte digestive généralisée chez le chevreau, avortement, balanoposthite, vulvo-vaginite chez l'adulte... (Thiry et <i>al.</i> , 2006)
Alphaherpèsvirus équin de type 1 (EHV-1)	Équidés	Atteintes respiratoires (rhinopneumonie...), neurologiques (myéloencéphalopathie...), avortement... (Khusro et <i>al.</i> , 2020)
Alphaherpèsvirus équin de type 4 (EHV-3)	Équidés	Atteintes cutanées : papules évoluant vers des vésicules ou des pustules voire vers des érosions ou des ulcères sur le vagin, le pénis, le prépuce et le périnée (occasionnellement sur les lèvres et les mamelles). (Hussey et <i>al.</i> , 2015)
Alphaherpèsvirus équin de type 4 (EHV-4)	Équidés	Rhinopneumonie équine, quelques avortements ... (Khusro et <i>al.</i> , 2020)
Alphaherpèsvirus félin de type 1 (FeHV-1)	Félidés	Trachéite, bronchite, conjonctivite, avortement (rarement) ... (Westermeyer et <i>al.</i> , 2009) (Maes 2012)
Alphaherpèsvirus humain de type 3 (HHV-3) ou virus varicelle-zona (VVZ)	Humains	Diverses affections cutanées (varicelle, zona ...) (Gershon et <i>al.</i> , 2013) et plus rarement : aberration chromosomique, avortement et prématurité (Mustonen et <i>al.</i> , 2001)
Alphaherpèsvirus phocin de type 1 (PhHV-1)	Phocidés	Atteintes localisées respiratoires ou généralisées systémiques (Martina et <i>al.</i> , 2003)
Alphaherpèsvirus porcin de type 1 (SuHV-1) = maladie d'Aujeszky	Suidés, chèvres, chiens, chats, chevaux, bovins	Toux, abattement, prurit, signes neurologiques divers ataxie, hyperesthésie, opisthotonos ... (Amoroso et <i>al.</i> , 2020) (Di Marco Lo Presti et <i>al.</i> , 2021). Des avortements sont décrits (Kluge et <i>al.</i> , 1974)

2.1.3. Phylogénie

A la fin des années 1980, des études mettent en évidence des similitudes immunologiques entre des herpesvirus chez des espèces différentes. Des réactions croisées de séroneutralisation et de Western blot montrent que le CHV-1 est immunologiquement lié aux *Herpes simplex* humains 1 et 2 (Manning et al., 1988). Par la suite, des homologies entre les séquences du FHV-1 et du CHV-1 ont été mises en évidence, ainsi que des similitudes antigéniques (Rota et al., 1990) (Limcumpao et al., 1990). Ce n'est qu'à partir des années 2010 que la phylogénétique du CHV-1 est étudiée en détail. Il a été démontré que les protéines issues du gène gD du CHV-1 et dans une moindre mesure du FHV-1 se sont avérées être les plus proches parentes de la protéine issue du gène gD du PhHV-1 (Figure 5) (Harder et al., 1997) (Martina et al., 2003).

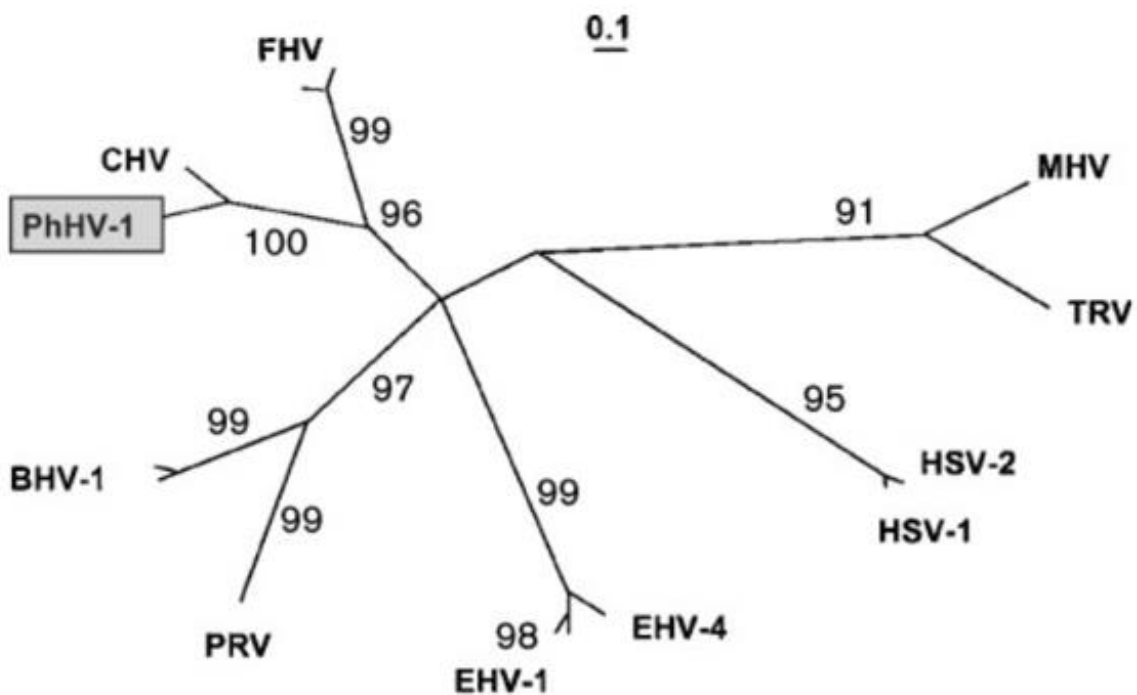


Figure 5 : Arbre phylogénétique non raciné des protéines équivalentes codées par les gènes gD des alphaherpèsvirus. Les longueurs des branches sont proportionnelles aux distances génétiques. Les nombres représentent les pourcentages de l'analyse par quartet (Martina et al., 2003)

Un autre travail visant à étudier les gènes de différents *Varicellovirus* a permis l'élaboration d'un arbre phylogénétique des ADN polymérases de ces derniers et met en évidence le fait que le CHV-1 et le FHV-1 ont un ancêtre commun proche et qu'ils en partagent également un avec les alphaherpèsvirus équins EHV1, 3 et 4 (Figure 6) (Papageorgiou et *al.*, 2016).

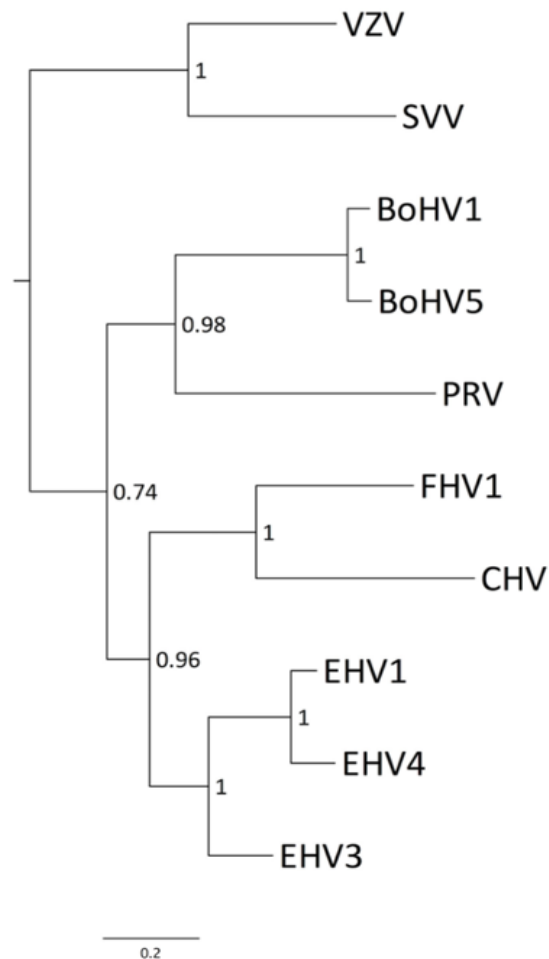


Figure 6 : Arbre phylogénétique des ADN polymérases des *Varicellovirus*. L'arbre a été ancré sur HSV1, qui est un membre du genre *Simplexvirus*. Les valeurs bootstrap sont indiquées aux nœuds sous forme de fractions. La barre d'échelle indique les substitutions par résidu d'acide aminé (Papageorgiou et *al.*, 2016)

Plus récemment, des études se sont penchées sur différents variants du CHV. Avant 2000, seuls trois souches d'ADN de CHV-1 avaient été collectées et séquencées au Royaume-Uni. Peu avant 2017, une souche brésilienne a été séquencée. Une analyse de la distance génétique montre que

celle-ci est très faible entre les souches du Royaume-Uni (0,005%) et que la souche brésilienne présente une distance de 0,34% avec ces dernières. Une analyse plus poussée de distance génétique entre les séquences protéiques issues de ces 4 souches différentes montre que la souche brésilienne est distante de 12.2% par rapport à celles du Royaume-Uni, ce qui amène à supposer que cette souche peut être issue d'une recombinaison avec un autre variant de CHV-1 (Kolb et *al.*, 2017). Une analyse comparative de souches provenant majoritairement des États-Unis, mais aussi du Brésil, de l'Australie et du Royaume-Uni tend à montrer que des événements de recombinaisons ont été possibles et qu'un variant isolé à San Antonio (États-Unis) découlerait d'une recombinaison impliquant une souche brésilienne (Lewin et *al.*, 2020).

2.1.4. Structure du virion

Le CHV est un virus à ADN bicaténaire. Cette molécule d'ADN est contenue au sein d'une nucléocapside icosaédrique faite de 162 capsomères, elle-même entourée d'un tégument majoritairement constitué de protéines. (Strandberg et *al.*, 1965). Ce virus est un virus enveloppé d'une bicouche phospholipidique contenant diverses glycoprotéines parmi lesquelles les glycoprotéines gB, gC et gD qui jouent un rôle dans l'immunité contre le CHV-1. En effet, elles sont la cible d'anticorps neutralisants (Poulet 2005). Une étude récente du génome du CHV fait état de l'existence de 11 de ces glycoprotéines et d'au moins 4 protéines membranaires distinctes (Papageorgiou et *al.*, 2016). Sa structure générale est représentée dans la Figure 7.

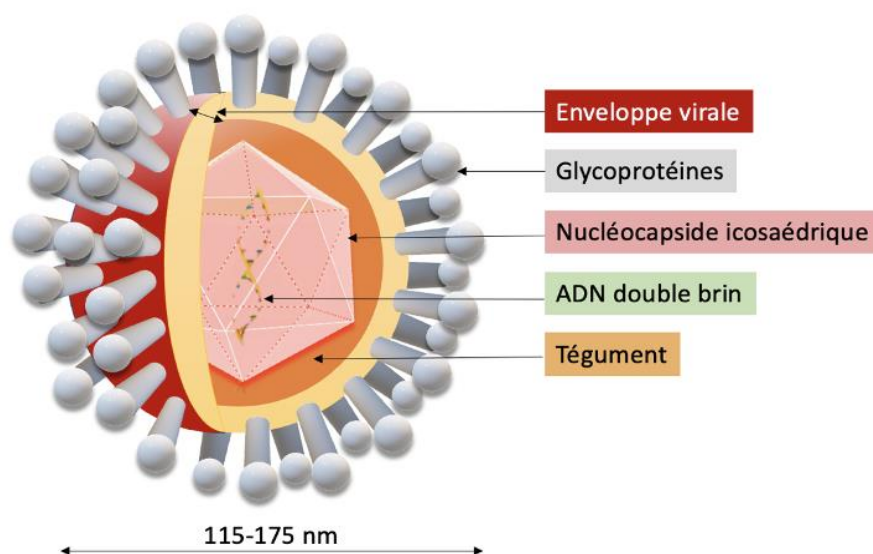


Figure 7 : Représentation schématique du virus CHV

Une observation au microscope électronique du virus sur des cellules rénales de chiots infectées (Figure 8) permet d'estimer la taille de celui-ci comme étant comprise entre 115 et 175 nm de diamètre (Strandberg et *al.*, 1965). Ce virion a une masse moléculaire de 63×10^6 daltons (Lust et *al.*, 1974).

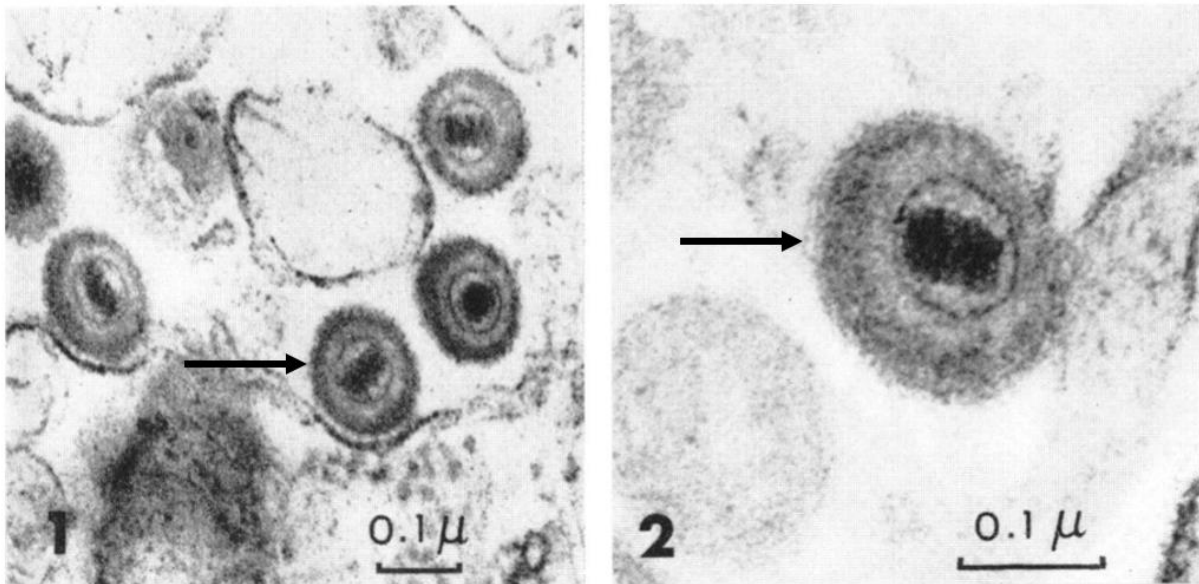


Figure 8 : Observations au microscope électronique du CHV (→) dans l'espace extracellulaire sur des cellules rénales infectées (Strandberg et *al.*, 1965)

2.1.5. Génome

Le CHV est un virus à ADN bicaténaire. Une étude comparative des antigènes de différentes souches connues de CHV-1 semble indiquer que ce virus est monotypique (antigéniquement stable) (Decaro et *al.*, 2008). Sa taille est estimée à environ 125 kpb.

Son organisation, classique des *Varicellovirus*, est représentée schématiquement ci-après (Figure 9) (Papageorgiou et *al.*, 2016).

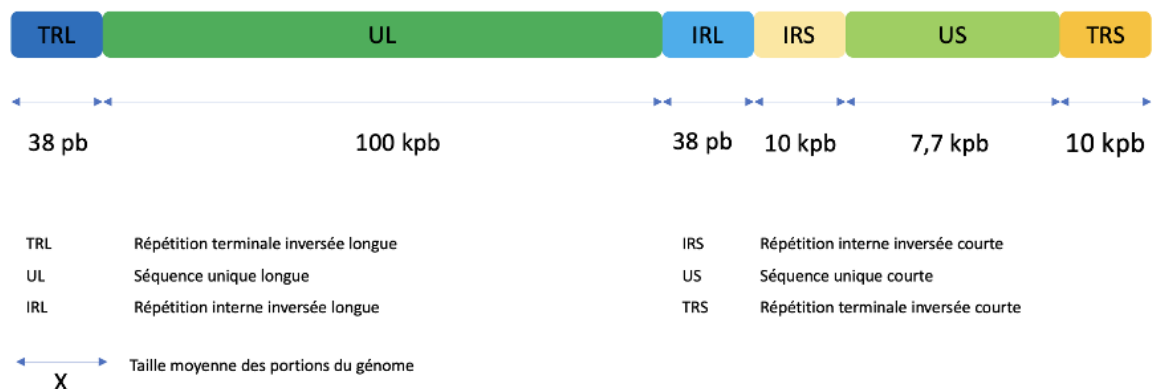


Figure 9 : Schéma simplifié de l'organisation génomique générale du CHV

L'analyse de composition nucléotidique générale de l'ADN du CHV montre que la proportion G+C est d'environ 31,6 %, ce qui est inférieur aux autres alphaherpèsvirus connus et séquencés (Rémond et *al.*, 1995). A titre de comparaison, l'EHV-1, le FeHV-1 et le BoHV-1 ont respectivement une proportion en bases G+C de 56,6, 45,8 et 72,6 % (Kolb et *al.*, 2017). A ce jour, 76 cadres de lecture ouverts ont été identifiés et codent pour des protéines fonctionnelles (Papageorgiou et *al.*, 2016).

2.1.6. Entrée du virus dans les cellules cibles

Jusqu'à fin 2021, très peu de données concernant les mécanismes d'entrée du CHV dans les cellules cibles étaient connus. Plusieurs travaux concernant d'autres alphaherpèsvirus ont néanmoins permis de mettre en évidence différentes interactions entre des glycoprotéines virales et des récepteurs cellulaires (Tableau II) (Azab et *al.*, 2017). Cependant, ces données ne sont pas disponibles ou encore extrapolables de manière certaine pour le CHV. Au début des années 2000, il a été mis en évidence que l'ajout d'héparine dans des cultures de cellules permissives au CHV (cellules MDCK) et de cellules non permissives comme des cellules rénales de lapin RK13 (Rabbit Kidney 13), de porc PKC (Porcine Kidney Cells), de bovins MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) et des cellules pulmonaires de hamster Hm-Lu1 (Hamster Lung 1), permet l'inhibition de l'attachement du CHV à ces cellules (Nakamishi et *al.*, 2000). Ces résultats soutiennent fortement l'hypothèse selon laquelle des récepteurs de type Héparane-Sulfate (HS) sont impliqués dans l'attachement viral de l'herpèsvirus canin aux cellules qu'il infecte.

Une étude beaucoup plus récente a permis d'apporter des éléments de réponses concernant l'entrée de ce virus dans les cellules cibles. (Eisa et *al.*, 2021). En effet, elle met en évidence le fait que le CHV entre par endocytose dans les cellules MDCK et non pas par fusion des membranes virale et cellulaire. L'utilisation d'inhibiteurs de la macropinocytose (inhibiteurs de l'échangeur Na⁺/H⁺, de l'actine, de la kinase des chaînes légères de myosine et de la phosphoinositide 3-kinase) a permis d'observer la diminution de la formation de plaques virales dans les premières heures, qui correspond à l'étape d'entrée du virus dans les cellules. Cela n'exclut cependant pas formellement une étape spécifique de fixation à un récepteur encore inconnu, pouvant expliquer la spécificité d'espèce.

De plus, l'utilisation de molécules ciblant spécifiquement des protéines de signalisation classiquement impliquées dans la macropinocytose, inhibe l'entrée du CHV dans les cellules MDCK étudiées. On ne peut cependant pas exclure que d'autres types cellulaires mettent en jeu d'autres modalités de pénétration des virions. Il est aussi mis en évidence que ces voies de signalisations impliquent des récepteurs à la tyrosine kinase tels que les EGFR et le PDGFR ainsi que des intégrines. En outre, l'observation de remaniements membranaires lamellipodes à la surface des cellules MDCK, au cours de la formation de la plaque virale, vient aussi conforter l'idée d'un mécanisme macropinocytaire.

Cette dernière permettant de manière générale l'internalisation de nutriments en phase liquide, cette étude (Eisa et *al.*, 2021) est partie du principe que l'entrée du CHV par ce mécanisme de macropinocytose est accompagnée de liquide extracellulaire. Cependant, l'utilisation d'un marqueur du liquide extracellulaire (dextran-AF647) a mis en évidence que le système macropinocytaire permettant l'entrée du CHV dans les cellules MDCK n'est pas accompagné d'une internalisation de liquide extracellulaire, ce qui diffère d'un mécanisme de macropinocytose classique. En parallèle, l'étude de la sortie, vers le cytosol, du CHV des macropinosomes a montré que l'acidification endosomale n'est pas une étape nécessaire, ce qui diffère d'autres alphaherpèsvirus tels que le EHV-1, le BoHV-1 ou encore le VVZ.

Enfin, l'entrée virale dans les cellules MDCK a été observée pour 2 souches virales de CHV dans cette étude. L'une des souches est la souche CHV/V777, isolée sur le poumon d'un Schnauzer miniature de 11 jours mort du CHV 1995 et l'autre est la souche CHV/0194, récupérée à partir d'un organe non renseigné en 1985 (Papageorgiou et *al.*, 2016). Aucune différence significative n'a été constatée entre les deux souches, ce qui laisse penser que peu importe la souche virale de CHV, un mécanisme proche de la macropinocytose classique est impliqué dans l'entrée du virus dans les cellules qui lui

sont permissives. Les connaissances progressent lentement et le mécanisme exact d'infection du CHV n'est pas encore totalement élucidé.

Tableau II : Glycoprotéines connues des principaux alphaherpèsvirus et leurs récepteurs cellulaires

(Azab *et al.*, 2017)

Virus et principales espèces cibles	Glycoprotéines virales	Fonctions	Récepteurs de la cellule cible
BoHV-1 (<i>Bovine herpesvirus 1</i>) - Bovins	gC	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
	gD	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Nectine-1
BoHV-5 (<i>Bovine herpesvirus 5</i>) - Bovins	gD	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Nectine-1
EHV-1 (<i>Equine Herpesvirus 1</i>) - Equidés	gC	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
	gD	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible • Catalyse la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • MHC-I
	gH/gL	<ul style="list-style-type: none"> • Initie ou régule la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Intégrine $\alpha 4\beta 1$
	gB	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible • Catalyse la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
EHV-4 (<i>Equine Herpesvirus 4</i>) - Equidés	gC	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
	gD	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible • Initiation de la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • MHC-I
	gB	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible • Catalyse la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
VVZ (<i>Varicella-zoster virus</i>) - Humains	gE	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • IDE • MPRci
	gH	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • MPRci
	gB	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible • Liaison à la cellule cible • Catalyse la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate • MAG • MPRci
	gI	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • MPRci
PRV = SuHV-1 (<i>Pseudorabies virus</i>) - Suidés	gC	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
	gD	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Nectine-1 • Nectine-2

		<ul style="list-style-type: none"> • Initiation de la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • PVR
	gB	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible • Catalyse la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • PILRα • NMMHC-IIA
HSV-1 (<i>Herpes simplex virus 1</i>) - Humains	gH/gL	<ul style="list-style-type: none"> • Initie ou régule la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Intégrine $\alpha 4\beta 1$
	gB	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible • Catalyse la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
	gH/gL	<ul style="list-style-type: none"> • Régule la fusion membranaire • Activation de la glycoprotéine gB 	<ul style="list-style-type: none"> • Intégrine $\alpha V\beta 3$ • Intégrine $\alpha V\beta 6$ • Intégrine $\alpha V\beta 8$
	gB	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible • Liaison à la cellule cible • Catalyse la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate • DC-SIGN • PILRα • MAG • NMMHC-IIA • NMMHC-IIB
HSV-2 (<i>Herpes simplex virus 2</i>) - Humains	gC	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
	gD	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible • Initiation de la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • HVEM • Nectine-1 • Nectin-2
	gB	<ul style="list-style-type: none"> • Catalyse la fusion membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Héparane-sulfate
Herpes B virus (<i>Macacine alphaherpesvirus 1</i>) - Humains	gD	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Nectine-1
CeHV-2 (<i>Cercopithecine alphaherpesvirus 2</i>) - Humains	gD	<ul style="list-style-type: none"> • Liaison à la cellule cible 	<ul style="list-style-type: none"> • Nectine-1

2.1.7. Caractéristiques physico-chimiques

Le CHV est un virus ayant une enveloppe phospholipidique ce qui le rend plus fragile dans le milieu extérieur que la plupart des virus non enveloppés. En effet, il est sensible à la chaleur et son pouvoir pathogène est inactivé sous certaines conditions de températures (Tableau III) (Pouille-Vidal 2020) (Carmichael et al., 1965b). La température préférentielle de réplication du CHV-1 se situe en dessous de 37° (Davidson 2014). Aucune donnée sur l'effet d'une congélation à -196°C dans l'azote liquide, très utile pour la conservation de semence, n'est disponible.

Tableau III : Influence de la température sur l'infectivité et l'inactivation du CHV

Températures	Effets sur le CHV
56°C	Inactivation en 5 à 10 minutes
37°C	Inactivation en 22 heures
4°C	Diminution infectivité en 24 jours
-20°C	Diminution infectivité en 5 jours

Le CHV est également sensible aux variations de pH et n'est stable que lorsque celui-ci est compris entre 6,5 et 7,6 (Carmichael et al., 1965b). Un pH inférieur à 5 ou supérieur à 8 garantit son inactivation (Greene 2012). La fragilité du CHV conférée par l'enveloppe phospholipidique se traduit également par une inactivation du virus par de nombreux détergents parmi lesquels : le formaldéhyde, les dérivés phénolés, les chloramines, les ammoniums quaternaires mais également par les solvants lipidiques tels que l'éther ou encore le chloroforme (Fontbonne 2011).

2.1.8. Culture virale et tropisme cellulaire

Le CHV présente un pantropisme cellulaire (il affecte plusieurs types de cellules). En effet, son ADN viral a été retrouvé dans des cellules épithéliales alvéolaires, des hépatocytes, des neurones, des cardiomyocytes, des cellules endothéliales, des macrophages ou encore des cellules des tubules rénaux (Evermann et al., 2011). Peu d'études relatives au tropisme du CHV en particulier ont été réalisées.

Cependant, le tropisme d'autres alphaherpèsvirus a été analysé plus en détails chez d'autres mammifères et l'on peut constater que les cellules épithéliales respiratoires, génitales et les cellules neuronales sont les principales cibles de ces virus (Tableau IV).

Tableau IV : Tropismes cellulaires d'alphaherpèsvirus autres que le CHV chez divers mammifères

Espèce	Alphaherpèsvirus	Tropisme	Source
Vache	BHV-1	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules épithéliales respiratoires et génitales (mâles et femelles) - Fibroblastes - Lymphocytes - Neurones 	Muykens et <i>al.</i> , 2007
Vache	BHV-4	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules endométriales - Cellules épithéliales génitales (mâles et femelles) et stromales utérines - Macrophages 	Donofrio et <i>al.</i> , 2007
Cheval	EHV-1	<ul style="list-style-type: none"> - Épithélium respiratoire - Tissus lymphoïdes - Cellules mononuclées - Cellules endothéliales (utérus et système nerveux central) - Sperme 	<p>Azab et <i>al.</i>, 2012</p> <p>Hebia-Fellah et <i>al.</i>, 2009</p>
Cheval	EHV-4	<ul style="list-style-type: none"> - Épithélium respiratoire 	
Humain	HSV-1	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules épithéliales orales, génitales et oculaires (hommes et femmes) - Neurones 	Veetil et <i>al.</i> , 2021
Humain	HSV-2	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules épithéliales majoritairement génitales (hommes et femmes) - Fibroblastes - Lymphocytes - Neurones 	Wang et <i>al.</i> , 2016

En ce qui concerne la culture cellulaire, seules des lignées canines permettent une culture *in vitro* du CHV et notamment les cellules MDCK (Nakamishi et *al.*, 2000). Il a été démontré que la température optimale de croissance du CHV dans ce type de culture avoisine les 35°C (Carmichael et *al.*, 1969b). La température testiculaire d'un chien mâle étant inférieure à celle du corps grâce à la position intrascrotale des testicules, on peut se demander si ces organes peuvent représenter un lieu préférentiel de multiplication du virus (Parkinson 2019).

2.2. Epidémiologie

2.2.1. Épidémiologie descriptive

L'épidémiologie descriptive est l'étude des caractéristiques et de l'évolution dans le temps et dans l'espace des phénomènes de santé. Elle permet de décrire une maladie dans une population donnée, à un moment donné, ou son évolution spatiale et temporelle. Cette démarche permet de déterminer l'importance sanitaire et/ou clinique d'une maladie.

2.2.1.1. Espèces cibles

Le CHV est un virus herpétique causant en partie des troubles de la reproduction chez les chiens, mais il touche également d'autres canidés. Entre 1998 et 2016, plusieurs études ont mis en évidence que le renard roux, le loup, le chacal, le coyote sont des espèces réceptives, chez qui on retrouve des anticorps anti-CHV et ce dans diverses régions du monde (Tableau V). Des anticorps dirigés contre le CHV ont été également détectés chez une autre espèce ne faisant pas partie des canidés, la loutre de rivière.

Tableau V : Recensement des espèces exposées au CHV par détection d'anticorps dirigés contre ce virus

Espèce	Pays	Référence et année de publication
Coyote (<i>Canis latrans</i>)	États-Unis d'Amérique	Evermann et <i>al.</i> , 1984
		Davidson et <i>al.</i> , 1992
Renard roux (<i>Vulpes vulpes</i>)	États-Unis d'Amérique	Davidson et <i>al.</i> , 1992
	Allemagne	Truyen et <i>al.</i> , 1998
	Australie	Robinson et <i>al.</i> , 2005
Loutre de rivière (<i>Lontra canadensis</i>)	États-Unis d'Amérique	Kimber et <i>al.</i> , 2000
Chacal (<i>Canis mesomelas</i>)	Namibie	Gowtage-Sequeira et <i>al.</i> , 2004
Loup gris (<i>Canis lupus</i>)	États-Unis d'Amérique	Almberg et <i>al.</i> , 2009
		Watts et <i>al.</i> , 2016

2.2.1.2. Sources et réservoirs

Le principal réservoir de l'herpèsvirus canin est constitué des chiens infectés chez qui le virus est rentré en latence. Ces chiens peuvent être source de virus lors d'une réactivation associée à une excrétion, tout comme peut l'être un chien primo-infecté.

2.2.1.3. Modes de transmissions et matières virulentes

2.2.1.3.1. Chez le chiot de moins de 3 semaines

Deux modes de contamination semblent possibles pour le chiot. En effet, une infection horizontale, *in utero*, par passage transplacentaire du virus, a été mise en évidence (Huxsoll et *al.*, 1970) (Stewart et *al.*, 1965) (Hashimoto et *al.*, 1982) (Hashimoto et *al.*, 1983) (Ronsse et *al.*, 2002) (Krogenæs et *al.*, 2014). Les chiots peuvent également se contaminer à la naissance, par voie oro-nasale, lors du passage naturel par les voies génitales de la chienne lors de la mise-bas (Cornwell et *al.*, 1969) (Huxsoll et *al.*, 1970), ce qui suggère que les sécrétions vaginales sont des matières virulentes. De manière plus anecdotique, le virus a été isolé dans les fèces de chiots inoculés par le CHV ce qui laisse à penser que ces dernières peuvent présenter une source de contamination par le virus (Huxsoll et *al.*, 1970) (Losurdo et *al.*, 2018).

2.2.1.3.2. Chez le chiot de plus de 3 semaines et les chiens adultes

La contamination est ici exclusivement verticale. La voie oro-nasale semble être la voie majoritaire de contamination pour ces individus (Ronsse et *al.*, 2002) (Ronsse et *al.*, 2004) (Ronsse et *al.*, 2005) (Krogenæs et *al.*, 2012) (Krogenæs et *al.*, 2014). Par conséquent, les sécrétions respiratoires et salivaires représentent des matières virulentes susceptibles de contaminer les animaux (Appel et *al.*, 1969) (Hashimoto et *al.*, 1983). Une autre voie, la voie vénérienne, est responsable de contamination lors d'accouplements (Poste et *al.*, 1971), bien que moins importante que la voie oro-nasale (Krogenæs et *al.*, 2012) (Krogenæs et *al.*, 2014). En effet, le virus a été retrouvé sur des écouvillons vaginaux (Miyoshi et *al.*, 1998) (Ronsse et *al.*, 2002) (Ronsse et *al.*, 2004) (Ronsse et *al.*, 2005). De plus, deux études datant du début des années 1980 indiquent que les produits (issus d'avortements dus au CHV) sont des matières virulentes susceptibles de contaminer les animaux en contact avec celles-ci : (Hashimoto et *al.*, 1982) (Hashimoto et *al.*, 1983). Une étude de 2009 suggère que l'excrétion virale oculaire pourrait également être un mode de transmission virale entre chiens via les sécrétions émanant des yeux des animaux atteints d'une forme locale oculaire (Ledbetter et *al.*, 2009c).

2.2.1.4. Séroprévalence du CHV à l'échelle mondiale

Diverses études portant sur le CHV ont été réalisées dans de nombreux pays et ce sur plusieurs continents. Elles consistent en la mise en évidence d'anticorps anti-CHV à l'aide de méthodes décrites dans le paragraphe 2.4.2.1.. Le Tableau VI récapitule la majorité des études de séroprévalence de l'herpèsvirus canin depuis 1974, chez des chiens adultes en majorité, depuis 1974.

Tableau VI : Récapitulatif des séroprévalences du CHV dans le monde, depuis 1974, dans l'ordre alphabétique des pays concernés

Année de publication de l'étude	Référence	Pays	Population étudiée	Séroprévalence
2008	Nöthling et al., 2008	Afrique du Sud	Chiens vivant en chenils	21,6 %
1976	Bibrack et al., 1976	Allemagne	Chiens de particuliers	12,0 %
1980	Schwers et al., 1980	Belgique	Mélanges de chiens de particuliers et d'élevages	1,0 %
2001	Van Gucht et al., 2001	Belgique	Chiens vivant en chenils	49,5 %
2002	Ronsse et al., 2002	Belgique	Chiens de particuliers	46,10 %
2002	Ronsse et al., 2002	Belgique	Chiens d'élevages	45,70 %
2005	Ronsse et al., 2005	Belgique	Chiens d'élevages	30,6 %
1994	Seo et al., 1994	Corée du Sud	Chiens de particuliers	58 %
1994	Seo et al., 1994	Corée du Sud	Chiens d'élevages	28 %
1969	Lundgren et al., 1969	Etats-Unis d'Amérique	Chiens reproducteurs d'expérimentation	1,70%
1969	Lundgren et al., 1969	Etats-Unis d'Amérique	Chiens de compagnie non pure race	12,80%
1969	Lundgren et al., 1969	Etats-Unis d'Amérique	Chiens d'élevages	0,0 %
1974	Fulton et al., 1974	Etats-Unis d'Amérique	Mélange de chiens d'élevages reproducteurs, d'élevages pédagogiques de chiens de particuliers	6,0%
2009	Dahlbom et al., 2009	Finlande	Chiens vivant en chenils	81,50%
1982	Delisle et al., 1982	France	Chiens de particuliers	0,50 %
1982	Delisle et al., 1982	France	Chiens d'élevages	28,4 %
1998	Lacheretz et al., 1998	France	Chiens avec problèmes reproducteurs	43,0 %
2002	Guigal et al., 2002	France	Chiens d'élevages	30,60 %
2014	Pratelli et al., 2014	Italie	Mélange de chiens de particuliers et de chiens vivant en collectivité	14,60 %

2010	Babaei et <i>al.</i> , 2010	Iran	Chiens de particuliers	19,10 %
2010	Babaei et <i>al.</i> , 2010	Iran	Chiens de particuliers	22,90 %
1990	Takumi et <i>al.</i> , 1990	Japon	Chiens de particuliers	26,2 %
2012	Krogenæs et <i>al.</i> , 2012	Norvège	Chiens de particuliers	80,0 %
2012	Krogenæs et <i>al.</i> , 2012	Norvège	Chiennes de particuliers	85,5 %
1977	Osterhaus et <i>al.</i> , 1977	Pays-Bas	Chiens de particuliers	2,80 %
1999	Rijsewijk et <i>al.</i> , 1999	Pays-bas	Chiens de particuliers	34,2 %
1999	Rijsewijk et <i>al.</i> , 1999	Pays-bas	Chien de particuliers et chiens mis 2 à 3 semaines en chenil	39,3 %
2007	Góngora et <i>al.</i> , 2007	Pérou	Chiens avec problèmes reproducteurs	32,10 %
1998	Reading et <i>al.</i> , 1998	Royaume-Uni	Chiens de particuliers	88,0 %
1980	Engels et <i>al.</i> , 1980	Suisse	Chiens de particuliers	6,30 %
2012	Ström Holst et <i>al.</i> , 2012	Suède	Mélange de chiens de particuliers et de chiens vivant en chenils	100,0 %
2012	Yeşilbağ et <i>al.</i> , 2012	Turquie	Chiens de particuliers	39,0 %
2012	Yeşilbağ et <i>al.</i> , 2012	Turquie	Chiens de refuge vivant en collectivité	62,1 %

On constate aisément ici que la séroprévalence est très variable selon les pays et les années. En effet, elle peut aller de 1,0 % en Belgique en 1980 (Schwers et *al.*, 1980) jusqu'à 100,0 % en Suède en 2012 (Ström Holst et *al.*, 2012), lorsque l'on prend en compte une population mixte de chiens de particuliers et de chiens vivant en collectivité.

2.2.2. Épidémiologie analytique

L'épidémiologie analytique permet d'appréhender les facteurs de risque et l'étiologie des maladies étudiées.

2.2.2.1. Relation entre âge des animaux et séropositivité vis-à-vis du CHV

Il existe un faible nombre d'études s'intéressant au lien possible entre l'âge des animaux et leur contamination par l'herpèsvirus canin. De plus, ces études fournissent des résultats qui ne sont pas toujours en accord et parfois équivoques. De nombreux travaux concluent qu'il n'y a pas de lien entre l'âge de l'animal et son titre en anticorps anti-CHV (Osterhaus et al., 1977) (Reading et al., 1998) (Nöthling et al., 2008) (Ronsse et al., 2002) (Góngora et al., 2007) (Yeşilbağ et al., 2012) (Krogenæs et al., 2014) (Rezaei et al., 2020). D'autres travaux (Seo et al., 1994) (Van Gucht et al., 2001) (Krogenæs et al., 2012), mettent en évidence que les titres en anticorps anti-CHV augmentent avec l'âge, sans que leurs résultats ne soient jugés significatifs. Enfin, plusieurs études entre 1998 et 2022 affirment qu'un lien peut être établi entre le statut sérologique des animaux atteints par le CHV et leur âge, ou entre la détection du CHV chez des animaux et leur âge (Tableau VII).

Tableau VII : Liste des études mettant en évidence un lien entre séropositivité ou détection du CHV et âge des animaux

Etudes	Lien entre âge et statut vis-à-vis du CHV
Lacheretz et al., 1998	73 % des animaux sérologiquement positifs au CHV ont entre 4 et 6 ans
Ronsse et al., 2004	Aucun chien de moins de 6 mois n'est sérologiquement positif au CHV Augmentation du titre en anticorps anti-CHV de la puberté jusqu'aux 2 ans de l'animal
Rota et al., 2020	Animaux prépubères et de moins de 18 mois ont un pourcentage plus faible de séropositifs par rapport aux autres catégories d'âges.
Piewbang et al., 2017	Nombre d'animaux chez qui le CHV est détecté augmente avec l'âge <ul style="list-style-type: none"> - < 3 mois : 15,6 % - 3 mois – 1 an : 15,6 % - 1-5 ans : 25,0 % - > 5 ans : 43,8 %
Castro et al., 2022	CHV détecté chez des individus majoritairement adultes

2.2.2.2. Lien entre sexe et positivité au CHV

En ce qui concerne le sexe des animaux atteints, la majorité des études (sérologiques ou PCR) s'accordent pour dire qu'il n'y pas de différence significative entre les mâles et les femelles (Osterhaus et *al.*, 1977) (Ronsse et *al.*, 2002) (Ronsse et *al.*, 2004) (Nöthling et *al.*, 2008) (Babaei et *al.*, 2010) (Parzefall et *al.*, 2011) (Góngora et *al.*, 2007) (Krogenæs et *al.*, 2012) (Yeşilbağ et *al.*, 2012). Une étude de 1998 (Lacheretz et *al.*, 1998) met en évidence qu'il y a proportionnellement plus de femelles atteintes que les mâles. Cependant, le risque d'erreur est de plus de 14 % pour ce résultat qu'il convient donc d'interpréter avec précaution. Une autre étude, datant de 1994 (Seo et *al.*, 1994) tend à dire le contraire en mettant en évidence le fait que les mâles sont plus touchés que les femelles. Aucun p-value n'est disponible pour ce résultat.

2.2.2.3. Influence de paramètres reproducteurs sur la positivité au CHV

La question de l'influence du statut reproducteur, et notamment de la gestation, sur les titres en anticorps peut se poser. Globalement, les études s'y intéressant tendent à dire qu'il n'y a pas de différence significative au niveau des titres en anticorps neutralisants contre le CHV entre les chiennes gestantes et non gestantes (Krogenaes et *al.*, 2012), (Ström Holst et *al.*, 2012) (Rezaei et *al.*, 2020) (Krogenaes et *al.*, 2014). De plus, se pose la question d'une influence éventuelle de la parité des chiennes au niveau de ces titres. Il n'y a pas de consensus sur cet aspect. Une majorité de travaux ne démontrent pas de lien entre nombre de gestation et titres en anticorps (Babaei et *al.*, 2010) (Krogenaes et *al.*, 2012) (Krogenaes et *al.*, 2014) tandis qu'une étude de 2004 a montré que les titres en anticorps anti-CHV ont tendance à être plus élevés avec une parité croissante (Ronsse et *al.*, 2004). En outre, deux études s'accordent pour dire que les chiens ayant des problèmes reproducteurs et vivant en chenils présentent des titres en anticorps neutralisants anti-CHV plus élevés que les chiens provenant de chenils ne présentant pas ces types de problèmes et ce de manière significative (Van Gucht et *al.*, 2001) (Dahlbom et *al.*, 2009). Enfin, aucune conclusion précise n'a été formulée concernant l'influence de précédents accouplements. En effet, une étude affirme que les mâles ayant déjà sailli ont des titres en anticorps plus élevés (Appel 1987) tandis que d'autres ne montrent pas de lien entre le nombre d'accouplement et ces titres (Krogenaes et *al.*, 2012) (Krogenaes et *al.*, 2014).

2.2.2.4. Influence des conditions de logement sur la positivité au CHV

La question de l'impact des conditions de logement des chiens (animal vivant seul ou en collectivité dans un chenil) vis-à-vis du CHV a été étudiée à de nombreuses reprises et les résultats des études divergent là encore. Certaines ne retrouvent pas de lien entre le logement et le titre en anticorps (Rijsewijk *et al.*, 1999) (Ronsse *et al.*, 2002) (Nöthling *et al.*, 2008) (Babaei *et al.*, 2010) (Ström Holst *et al.*, 2012) (Pratelli *et al.*, 2014) (Monteiro *et al.*, 2016) (Rezaei *et al.*, 2020). Au contraire, il apparaît dans certains travaux que la séroprévalence soit plus importante chez les animaux vivant en collectivité au sein d'un chenil, notamment dans les élevages (Yeşilbağ *et al.*, 2012) (Osterhaus *et al.*, 1977) (Schwers *et al.*, 1980) (Bibrack *et al.*, 1976). De plus, il a été mis en évidence que plus le nombre de chiens est important au sein d'une collectivité et plus les titres en anticorps neutralisants anti-CHV sont élevés (Guigal *et al.*, 2002) (Ronsse *et al.*, 2004) (Ronsse *et al.*, 2005) (Dahlbom *et al.*, 2009) (Van Gucht *et al.*, 2001). Ceci est remis en question par une étude qui n'établit pas de lien entre la taille du chenil et la séroprévalence (Nöthling *et al.*, 2008).

2.2.2.5. Influence de la participation à des événements collectifs dans la positivité au CHV

Le lien entre participation à des expositions, des concours ou encore des événements de chasse, où de nombreux animaux sont susceptibles de se croiser et les titres en anticorps anti-CHV des chiens y assistant a été ponctuellement étudiée. Trois études se sont penchées sur le sujet et aucune ne met en évidence de lien entre participation à des activités rassemblant un nombre conséquent d'animaux et des titres élevés en anticorps (Ronsse *et al.*, 2004) (Krogenaes *et al.*, 2012) (Krogenaes *et al.*, 2014). Une étude fait cependant remarquer qu'aucun distinguo n'a été fait en fonction de la fréquence de participation à ces rassemblements de chiens ce qui pourrait expliquer l'absence de lien entre participation et titres en anticorps (Ronsse *et al.*, 2004).

2.2.2.6. Influence de l'hygiène sur la séroprévalence du CHV

Peu d'études se sont penchées sur l'impact des conditions d'hygiène dans le logement des chiens sur la séroprévalence du CHV. Il semblerait que, dans le cadre du syndrome de la toux de chenil, les titres en anticorps anti-CHV soient plus élevés dans les chenils indemnes de ce syndrome. Ceci

apparaît comme étant d'autant plus vrai pour les femelles que pour les mâles (Ronsse et *al.*, 2004). Une étude plus récente de 2016 confirme le lien entre haute densité d'animaux dans les chenils et présence du CHV dans le cadre du syndrome toux de chenil (Monteiro et *al.*, 2016).

2.2.2.7. Étude du lien entre le cycle œstral de la chienne et la positivité au CHV

En 1971, il est noté que les lésions vaginales liées au CHV ont tendance à apparaître au moment du proestrus et à disparaître au moment de l'anoestrus (Poste et *al.*, 1971). Les titres en anticorps semblent varier selon l'étape du cycle œstral de la chienne, avec des titres significativement plus faibles au début du dioestrus qu'au moment de l'anoestrus, du proestrus et qu'au milieu du dioestrus (Ronsse et *al.*, 2004). Ceci est contredit par une étude plus récente qui ne met pas en évidence de changement significatif au niveau des titres en anticorps anti-CHV au cours du cycle sexuel d'une chienne (Ström Holst et *al.*, 2012).

2.3. Pathogénie de l'herpèsvirus canin

2.3.1. Pathogénie chez le chiot de moins de 3 semaines

Un chiot de moins de 3 semaines affecté par le CHV se contamine par voie oro-nasale via un contact direct avec des animaux infectés excréteurs ou encore lors de la parturition, au moment du passage dans les voies génitales de la mère infectée (Bartsch et *al.*, 1974). La réplication virale se déroule principalement au niveau de la muqueuse nasopharyngée et des amygdales (Karpas et *al.*, 1968). Secondairement, la réplication virale peut se dérouler au niveau des nœuds lymphatiques bronchiques et rétropharyngés (Karpas et *al.*, 1968) (Appel et *al.*, 1969). S'ensuit alors une virémie permise par les lymphocytes et les monocytes (Wright et *al.*, 1970) (Poulet 2005). La dissémination virale par voie hématogène fait que l'on retrouve alors le CHV dans de très nombreux organes : reins, rate, poumons, cœur, foie (Carmichael et *al.*, 1965a) (Carmichael 1970) (Schulze et *al.*, 1998) (Larsen et *al.*, 2015) ou encore dans le système nerveux central (Huxsoll et *al.*, 1970) (Jager et *al.*, 2017), pour n'en citer que quelques-uns. Les chiots meurent généralement d'une maladie systémique avant que des signes neurologiques puissent être constatés (Greene 2012). L'immunité et la thermorégulation ne sont pas optimales lors des premières semaines de vie ce qui contribue à la

mise en place de la forme systémique néonatale du CHV (Carmichael et *al.*, 1969c). Cette dernière est généralement mortelle.

2.3.2. Pathogénie chez le chiot de plus de 3 semaines et le chien adulte

Tout comme les chiots de moins de 3 semaines, les chiens plus âgés peuvent se contaminer par voie orale ou nasale (Burr et *al.*, 1996). La multiplication virale primaire se déroule au sein des amygdales, des glandes salivaires parotidiennes (Burr et *al.*, 1996), du nasopharynx et au niveau conjonctival (Greene, 2012). Les nœuds lymphatiques rétro pharyngés et bronchiques représentent des lieux de multiplication secondaire (Appel et *al.*, 1969). Tout comme les chiots en période néonatale, il s'ensuit une virémie permise par les lymphocytes et les monocytes (Wright et *al.*, 1970) (Poulet 2005). La réponse immunitaire peut lui permettre d'éliminer le virus ou ce dernier peut entrer en latence dans divers organes (cf paragraphe 2.2.5.). A la fin des années 60, une étude a mis en évidence que des adultes naïfs inoculés avec le CHV par voie intranasale présentent des signes cliniques (toux, jetage ...) et excrètent le virus jusqu'à 18 jours post-inoculation. Des animaux inoculés une seconde fois excrètent le virus mais n'ont pas de signes cliniques (Karpas et *al.*, 1968). La voie vénérienne est également une voie de contamination (Ronsse et *al.*, 2005). La capacité de multiplication du virus semble meilleure au sein de la muqueuse vaginale que respiratoire *ex vivo* (Li et *al.*, 2016). Le virus peut se multiplier au sein des muqueuses du vagin, du pénis et du prépuce (Hill et *al.*, 1974). Le virus pourrait entrer en latence au niveau des nœuds lymphatiques lombosacrés (Miyoshi et *al.*, 1998). Enfin, des études suggèrent qu'une contamination par voie oculaire serait possible (Carmichael 1970) (Ledbetter et *al.*, 2009a) et que le sac conjonctival serait un lieu de multiplication primaire.

2.3.3. Pathogénie lors d'une infection in utero

Il semble que certains chiots de moins de 3 semaines mourant du CHV puissent être contaminés in utero et non pas lors du passage par le canal pelvien lors de la naissance. En effet, les chiots développant une forme systémique mortelle et succombant à moins d'une semaine d'âge seraient plus probablement contaminés lors de la gestation et l'effet du virus sur les chiots lors de la gestation varierait en fonction du moment auquel intervient l'infection (Greene 2012). Le CHV serait en effet, capable de passer la barrière placentaire (Stewart et *al.*, 1965) (Hashimoto et *al.*, 1982). Il

a été montré que des chiots sont morts du CHV suite à une inoculation du virus à un stade avancé de la gestation chez des chiennes naïves par rapport à ce virus ce qui suggère bel et bien un passage transplacentaire du virus (Hashimoto et *al.*, 1983).

2.3.4. CHV et immunité

Le CHV est faiblement immunogène (Carmichael 1970). Diverses études mettent en évidence la formation d'anticorps anti-CHV neutralisants après l'infection par le virus (Carmichael 1970) (Ledbetter et *al.*, 2009c). Il a été montré que ces derniers apparaissent une à deux semaines après un premier épisode infectieux induit par le CHV. La circulation de ces anticorps peut être retrouvée jusqu'à 8 mois post infection. De plus, une sortie de latence associée à une réactivation virale induit une augmentation des anticorps anti-CHV une semaine après cet événement. Le titre en anticorps diminue ensuite sur plusieurs semaines (Ledbetter et *al.*, 2009c). Une étude s'intéressant aux glycoprotéines (gp) immunogènes du CHV a mis en évidence que les gp 47, 80 et 145/112 sont les glycoprotéines majoritairement impliquées dans la réponse immunitaire d'un animal infecté par le CHV. Les données tendent à laisser penser que la gp 145/112 est la plus immunogène et permet la production d'anticorps neutralisant à tout stade de l'infection tandis que les gp 47 et 80 induisent une production d'anticorps dans les stades ultérieurs de l'infection chez le chien (Xuan et *al.*, 1992). Une étude dans laquelle des souris ont été immunisées avec des virus recombinant exprimant les glycoprotéines B (VgB), C (VgC) et D (VgD) a montré que ces souris ont produits des anticorps neutralisants dirigés contre le CHV. Celles ayant reçu le VgB et le VgC ont produit des anticorps neutralisants dépendants du système du complément, tandis que les souris ayant reçu le VgD ont produit des anticorps, eux aussi neutralisants, mais indépendant du complément (Xuan et *al.*, 1997). En ce qui concerne l'immunité des chiots face au CHV, l'immunité acquise via la mère dans les premières heures de vie semble primordiale dans la survie des chiots infectés par le CHV. Des chiots infectés allaitant des chiennes séropositives portent le virus, qui peut être retrouvé dans des tissus oropharyngés mais ils restent asymptomatiques (Huxsoll et *al.*, 1970) (Greene 2012). Au contraire, des chiots infectés allaitant des chiennes séronégatives développent la forme systémique néonatale le plus souvent fatale (Greene 2012). La présence d'anticorps ou de lymphocytes maternels dans le colostrum peut expliquer le fait que des chiennes infectées par le virus et donnant naissance à des animaux malades produisent ensuite des chiots apparemment sains. La présence d'anticorps sériques chez une chienne gestante précédemment infectée semble également empêcher une

virémie et donc la propagation de l'infection virale au fœtus (Greene 2012). Même si cela est plus rare, des adultes immunocompromis (traitement immunosuppresseur par exemple) peuvent développer des formes systémiques mortelles similaires à celles retrouvées chez les chiots en période périnatale (Malone et *al.*, 2010).

2.3.5. La latence du CHV

On dit qu'une infection virale est latente lorsque l'entièreté du génome du virus est conservée dans une cellule hôte. Son expression est drastiquement restreinte, c'est-à-dire qu'aucune particule virale n'est produite et que de rares antigènes viraux le sont (Speck 2010). Comme de nombreux autres herpèsvirus, le CHV est capable de rentrer en latence (Miyoshi et *al.*, 1998). La latence du CHV n'est pas totalement élucidée mais il a été démontré que le virus latent peut être retrouvé dans divers organes, notamment au niveau de ganglions lymphatiques, comme notamment les ganglions lymphatiques trigéminés, reconnus comme étant des lieux de latence d'herpèsvirus chez d'autres espèces (FHV-1, BoHV-1, EHV-1) (Miyoshi et *al.*, 1998). On retrouve également le génome viral latent du CHV dans d'autres ganglions lymphatiques comme les rétropharyngés, les lombo-sacrés, les médiastinaux, les hypogastriques ou encore dans les amygdales (Burr et *al.*, 1996) (Miyoshi et *al.*, 1998) (Greene 2012). Des études montrent que la durée de l'infection, lors d'une réactivation du CHV latent, est plus courte que lors d'une primo-infection. (Okuda et *al.*, 1993a) (Ledbetter et *al.*, 2009a) (Ledbetter et *al.*, 2009c). Lors d'une sortie de latence du CHV consécutive à l'administration d'une dose immunosuppressive de prednisolone systémique chez des chiens adultes, il semble que la durée des signes cliniques oculaires, de l'excrétion virale et l'augmentation des anticorps anti-CHV sériques sont nettement réduite par rapport à la durée lors d'une primo-infection (Ledbetter et *al.*, 2009c). Plusieurs facteurs semblent permettre une sortie de latence virale. L'administration de certaines substances, comme la prednisolone à dose immunosuppressive permet une réactivation virale et une excrétion du CHV (Okuda et *al.*, 1993a) (Ledbetter et *al.*, 2009c) (Ledbetter et *al.*, 2009b) (Okuda et *al.*, 1993b) (Kawakami et *al.*, 2010) (Mundy et *al.*, 2012). D'autres traitements, comme des chimiothérapies, seraient associés à une réactivation du virus comme lors du traitement de certains lymphomes (Kakuk et *al.*, 1969) (Ledbetter et *al.*, 2009b) (Malone et *al.*, 2010). Le stress serait également favorisant (Erles et *al.*, 2005) (Erles et *al.*, 2004). En effet, l'introduction de jeunes animaux séronégatifs au sein d'un groupe d'animaux adultes séropositifs a

été associée à une recrudescence du virus chez ces derniers, ce qui suggère que le stress serait bel et bien un élément à prendre en compte (Greene 2012). Plusieurs études se sont également intéressées aux effets du cycle œstral de la chienne et de la gestation sur une possible réactivation virale. La gestation en elle-même, si elle est gérée avec le minimum de stress, ne semble pas favoriser une sortie de latence (Ström Holst et *al.*, 2012). Le pro-œstrus serait en revanche une période associée à une apparition de signes locaux dus à une réactivation virale, qui régresserait au moment de l'anoestrus (Poste et *al.*, 1971). Une atteinte de l'état général par une autre affection comme une pathologie respiratoire (Erls et *al.*, 2004) ou un lymphome (Kakuk et *al.*, 1969) semble être liée à une sortie de latence du CHV. Enfin, des études ont mis en évidence que des substances comme la cyclosporine administrée par voie intraoculaire (Ledbetter et *al.*, 2012), le cyclophosphamide en injection unique (Mundy et *al.*, 2012) ou encore une dose de rayonnement de 50 Gy administrée à la surface oculaire par radiothérapie bêta au strontium-90 (Nicklin et *al.*, 2014) ne permettent pas la réactivation du CHV latent. Enfin, aucune étude à ce jour ne met en évidence de CHV latent ou simplement présent dans la semence des chiens.

2.4. Diagnostic

2.4.1. Diagnostic clinique

2.4.1.1. Forme respiratoire

Chez les jeunes animaux, le CHV provoque généralement une atteinte des voies respiratoires supérieures le plus souvent modérée. Chez les adultes, l'atteinte est le plus souvent subclinique (Gaskell et *al.*, 1999). Elle est rarement mortelle, sauf chez les animaux naturellement immunodéprimés ou sous traitement immunosuppresseur (Kawakami et *al.*, 2010). Il peut alors être observé une trachéobronchite caractérisée, entre autres, par des éternuements, de la toux et du jetage. Récemment, des cas mortels de formes respiratoires dues au CHV ont été décrits sur des animaux non immunodéprimés (Kumar et *al.*, 2015). Ceux-ci se sont traduits par diverses atteintes telles qu'une pneumonie associée à de la toux et une dyspnée ou encore une rhinotrachéite caractérisée par du jetage et de la toux. Les premières descriptions d'épisodes respiratoires

remontent à la fin des années 60. Chez de jeunes chiens chez qui le virus a été inoculé par voie oro-nasale, diverses formes cliniques sont mises en évidence : absence de signe clinique, léger jetage en passant par une toux paroxystique (Karpas et *al.*, 1968). D'autres individus, infectés par la même voie, présentent tous une atteinte respiratoire haute caractérisée par une rhinite légère et un jetage, sans toux, auto résolue au bout d'une semaine (Appel et *al.*, 1969). Cependant, une atteinte respiratoire due au CHV uniquement est rare. En effet, ce virus intervient souvent au sein du syndrome « toux du chenil ». Ce dernier est caractérisé par une association de plusieurs agents pathogènes à tropisme respiratoire dont notamment la bactérie *Bordetella bronchiseptica* et le virus *Parainfluenza* (Evermann et *al.*, 2011). D'autres agents bactériens comme des mycoplasmes et des agents viraux comme l'Adénovirus canin de type 2, le virus de la Maladie de Carré, le Réovirus canin, certains coronavirus et l'Herpèsvirus canin sont également impliqués dans ce syndrome (Ford 2011). En effet, lors d'études visant à identifier les agents pathogènes mis en cause lors de diverses affections respiratoires chez le chien, l'analyse d'écouvillons nasaux a permis de révéler la présence du CHV en association avec un ou plusieurs des agents pathogènes cités précédemment (Erles et *al.*, 2004) (Erles et *al.*, 2005) (Lavan et *al.*, 2015) (Monteiro et *al.*, 2016) (Piewbang et *al.*, 2016) (Wang et *al.*, 2017). Le CHV, pouvant être en latence chez des adultes infectés, se réactiverait sous le stress pouvant notamment être induit par l'action d'autres agents pathogènes (Erles et *al.*, 2004).

2.4.1.2. Forme génitale

La forme génitale du CHV concerne les individus adultes des 2 sexes. Elle reste le plus souvent localisée et n'affecte pas l'état général de l'animal (Poste et *al.*, 1971).

2.4.1.2.1. Chez la femelle

On peut observer des lésions lympho-folliculaires ou papulo-vésiculaires (Greene 2012) (Poulet 2005) (Hashimoto et *al.*, 1983) (Hill et *al.*, 1974). Celles-ci mesurent entre 2 à 3 mm de diamètre en moyenne (Hashimoto et *al.*, 1983). Elles sont présentes au niveau de la muqueuse vestibulaire, le plus souvent autour de l'orifice urétral (Hill et *al.*, 1974) et peuvent s'étendre à toute la muqueuse vaginale dans le cas d'affections sévères (Poste et *al.*, 1971). Ces lésions sont associées à une vaginite plus ou moins sévère caractérisée par une hyperhémie de la muqueuse vaginale (Greene

2012). Conjointement, on retrouve des pétéchies et des hémorragies sous muqueuses entre ces papulo-vésicules (Hill et *al.*, 1974) (Greene 2012).

2.4.1.2.2. Chez le mâle (Hill et *al.*, 1974)

Les chiens présentent des lésions similaires aux femelles (Greene 2012). En effet, on peut observer des nodules lymphoïdes, moins nombreux et moins volumineux que chez la femelle, associés à des pétéchies (Figure 10) et à une inflammation de la muqueuse, au niveau du fornix préputial et à la base du pénis. Un écoulement séreux est présent au niveau du prépuce. Contrairement à la femelle qui n'exprime pas de douleur ou de gêne lorsqu'elle présente la forme génitale du CHV, le mâle présente une sensibilité accrue à la manipulation de son pénis, surtout lors de l'extériorisation du fourreau. Le plus souvent, les signes régressent spontanément au bout de 5 jours, sans séquelles apparentes.

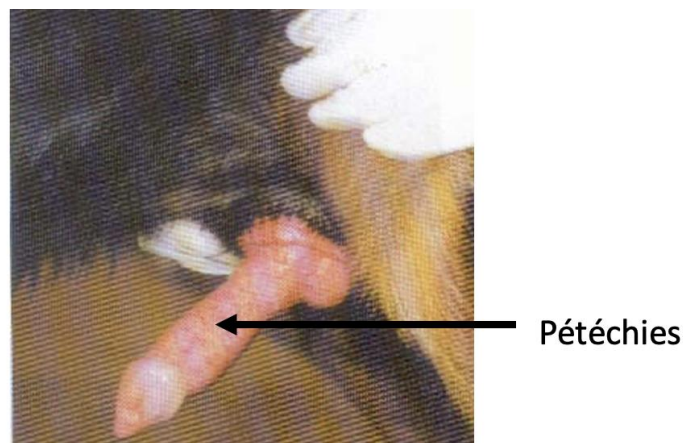


Figure 10 : Pétéchies sur le pénis d'un mâle atteint du CHV (Service de Pathologie de la Reproduction, Oniris)

2.4.1.3. Forme oculaire

Après une infection in utero ou dans les premières semaines de vie par le CHV, les chiots présentent une virémie. Elle induit une infection des tissus intraoculaires se traduisant par divers signes cliniques, le plus souvent bilatéraux (Carmichael et al., 1965a). Cependant, tous les chiots atteints par une virémie due au CHV ne présentent pas forcément d'atteinte oculaire et celle-ci peut ne pas être visible, les nouveau-nés n'ouvrant les yeux que vers 2 semaines d'âge. Chez les adultes, et contrairement aux chiots, l'atteinte oculaire due au CHV ne touche pas les structures intraoculaires

mais concerne la partie externe et l'œil et les paupières. Les signes cliniques sont souvent plus modérés et restent localisés (Ledbetter *et al.*, 2009c). Le Tableau VIII détaille les différents signes cliniques observables lors d'une atteinte oculaire provoquée par le CHV.

Tableau VIII : Résumé des diverses formes oculaires de CHV

	Présentations cliniques		Sources
Chiots de moins de 3 semaines	<ul style="list-style-type: none"> - Kératite - Effet Tyndall positif - Panuvéite - Œdème de la cornée - Chorioretinite - Cataracte - Synéchies antérieures 		Albert <i>et al.</i> , 1976 Percy <i>et al.</i> , 1971
	Séquelles oculaires possibles si survie : <ul style="list-style-type: none"> - Cataracte - Cécité - Dysplasie et dégénérescence rétinienne - Atrophie du nerf optique 		
Chiens et chiots de plus de 3 semaines	Blépharite	<ul style="list-style-type: none"> - Locale ou généralisée - Érythème - Œdème - Exsudats possibles 	Ledbetter <i>et al.</i> , 2009a Ledbetter <i>et al.</i> , 2009b Ledbetter <i>et al.</i> , 2009c
	Conjonctivite	<i>Expression la plus fréquente</i> <ul style="list-style-type: none"> - Hyperhémie - Epiphora - Chemosis - Ulcération possible - Pétéchies possibles 	
	Kératite ulcérationnelle ou non	<i>Formes fréquentes</i> <ul style="list-style-type: none"> • Forme ulcérationnelle : <ul style="list-style-type: none"> - Ulcère superficiel punctiforme évoluant vers un ulcère dendritique Peut évoluer en ulcère en carte de géographie si très étendu <ul style="list-style-type: none"> - Epiphora muqueux, rarement purulent sauf si surinfections. 	

		<ul style="list-style-type: none"> • Forme non ulcérate : <ul style="list-style-type: none"> - Moins fréquente que la forme ulcérate - Néovascularisation cornéenne sous forme d'un anneau avec infiltrations leucocytaires dans la cornée 	
--	--	--	--

2.4.1.4. Forme abortive et autres troubles de la reproduction

Une atteinte par le CHV chez des chiennes adultes peut se traduire par divers troubles de la reproduction. Au début des années 1970, une étude émet l'hypothèse que le virus pourrait être la cause de résorptions embryonnaires chez des chiennes gestantes (Poste et *al.*, 1971). Plusieurs infections expérimentales de chiots par voie transplacentaire via inoculation intraveineuse du virus chez des mères ont permis notamment de mettre en évidence la mise en place d'une placentite au cours de l'infection. Cliniquement, des chiennes inoculées avec le virus au deuxième tiers de gestation produisent des portées avec des chiots momifiés, des chiots morts et des chiots cliniquement normaux. Une inoculation à 30 jours de gestation provoque un avortement dans les 2 à 3 semaines qui suivent. Enfin, il a été montré qu'une infection des chiots par voie transplacentaire à 40 jours de gestation provoque une mise-bas prématurée (Hashimoto et *al.*, 1982) (Hashimoto et *al.*, 1983). Des réactivations virales suite à un stress ou à une immunosuppression pourraient expliquer des troubles reproducteurs persistants chez les chiennes atteintes (Greene 2012).

2.4.1.5. Forme systémique chez le chiot âgé de moins de 3 semaines

La forme systémique touche quasi exclusivement les chiots âgés de moins de 3 semaines. La contamination peut se faire d'une manière transplacentaire, via un contact des chiots contaminés, via des sécrétions d'une mère contaminée ou encore lors du passage par la filière pelvienne lors de la mise bas (Greene 2012). La mort survient en moyenne 1 à 2 jours après le début des signes cliniques (Carmichael et *al.*, 1965a) (Greene 2012). Les principaux signes cliniques observables sont : une dépression, une anorexie, une léthargie, des pleurs et des selles verdâtres (Greene 2012) (Percy et *al.*, 1971). D'autres signes, tels qu'un épiphora muqueux, une tachypnée et une polypnée ainsi que des vomissements peuvent être constatés (Watt et *al.*, 1974) (Carmichael et *al.*, 1965a). Il est également possible que des papules, un œdème sous-cutané et un érythème en régions

abdominale et inguinale, ainsi que des pétéchies soient présents sur les chiots atteints (Carmichael et *al.*, 1965a) (Greene 2012).

Peu de chiots infectés par le CHV avant 3 semaines y survivent mais, lorsque c'est le cas, des séquelles neurologiques sont possibles : ataxie, cécité (Percy et *al.*, 1971) (Greene 2012) ou encore troubles vestibulaires (Greene 2012).

2.4.2. Diagnostic expérimental

2.4.2.1. Diagnostic indirect : la sérologie

Un des moyens orientant le diagnostic est la sérologie. Elle permet la mise en évidence d'anticorps anti-CHV dans le sérum des animaux testés. Cela peut correspondre à une production d'anticorps suite à un premier contact avec le virus ou à une réactivation suite à une latence. Les adultes étant souvent asymptomatiques, la réalisation de tests sérologiques permet de repérer les animaux dits à risque et donc d'apprécier la circulation du virus au sein d'une population ou d'un élevage. Cependant, il a été démontré que les anticorps neutralisants produits suite à une infection par le CHV ne durent au maximum que quelques mois (Ronsse et *al.*, 2005). La détection d'anticorps peut également être consécutive à l'injection d'un vaccin anti-CHV. La détection de ces anticorps ne fait donc pas office de diagnostic de certitude et l'épidémiologie et la clinique sont à prendre en compte. Plusieurs techniques sérologiques existent et ont été utilisées afin de révéler la présence d'anticorps anti-CHV. Les deux plus couramment utilisées sont la séroneutralisation et l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Tableau IX). Il a été démontré qu'une réaction croisée entre les anticorps anti CHV et anti FHV-1 existait, ce qui ne fait pas de la séroneutralisation une méthode 100% spécifique du CHV. En effet, les anticorps anti-CHV peuvent se fixer sur les antigènes de l'herpèsvirus félin (Xuan et *al.*, 1992). Une étude datant de 1990 (Takumi et *al.*, 1990) a montré que la technique ELISA est plus sensible que la séroneutralisation, ce qui a été plus tard confirmé par d'autres études (Ronsse et *al.*, 2002) (Ronsse et *al.*, 2005) (Yeşilbağ et *al.*, 2012). Cependant, une étude de 2008 ne met pas en exergue une grande différence que ce soit au niveau de la sensibilité ou de la spécificité de ces deux techniques (Nöthling et *al.*, 2008). En pratique, nous pouvons constater que les deux techniques sont régulièrement utilisées (Tableau IX). Deux autres techniques, moins employées, permettent également la mise en évidence d'anticorps anti-CHV : l'immunofluorescence indirecte (IFI) et l'immunopéroxydase en monocouche (IPMA) (Tableau IX). L'IFI est une technique qui permet

la révélation d'anticorps sériques par ajout d'un anticorps ciblant l'anticorps recherché. Concrètement, des antigènes de l'agent pathogène recherché sont fixés sur un support solide. Le sérum de l'individu à tester est mis en contact avec ce dernier. Dans le cadre de la recherche d'anticorps dirigés contre l'herpèsvirus canin, des anticorps anti anticorps anti-CHV, marqués par un fluorochrome sont utilisés. S'il y a présence d'anticorps anti-CHV dans le sérum à tester, une fluorescence est alors émise, par fixation du second anticorps fluorescent sur ces derniers (Figure 11). En pratique, plusieurs dilutions en série sont réalisées. Après lavages, la fluorescence peut être mise en évidence via un microscope à épifluorescence ou encore un microscope confocal. Le résultat fourni est un titre en anticorps. Un seuil de positivité est fixé à 1/x. Cela veut dire que si aucune fluorescence n'est émise pour $n < x$, on considère que le résultat de la sérologie est négatif.

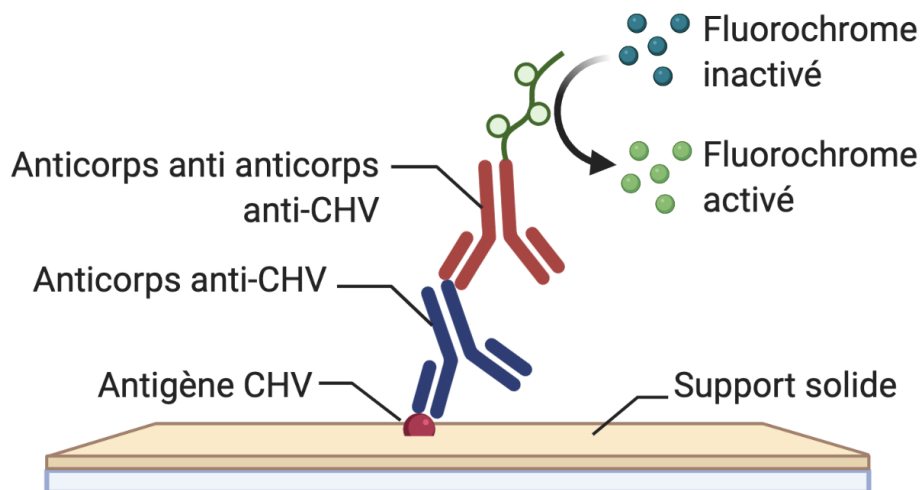


Figure 11 : Principe général de l'immunofluorescence indirecte (créée sur Biorender.com)

Quant à elle, L'IPMA nécessite des cultures cellulaires préalablement infectées par le virus étudié, ce qui rend la réalisation de cette technique en routine peu pratique. L'immunofluorescence indirecte encore utilisée mais est plus contraignante en pratique que l'ELISA ou la séroneutralisation.

Tableau IX : Liste non exhaustive des différentes techniques sérologiques utilisées au cours des années afin de détecter des anticorps anti CHV dans des études depuis 1969

Méthode utilisée	Études dans lesquelles la technique a été utilisée
Séroneutralisation	Lundgren et <i>al.</i> , 1969 Fulton et <i>al.</i> , 1974 Bibrack et <i>al.</i> , 1976 Osterhaus et <i>al.</i> , 1977 Engels et <i>al.</i> , 1980 Schwers et <i>al.</i> , 1980 Takumi et <i>al.</i> , 1990 Reading et <i>al.</i> , 1998 Nöthling et <i>al.</i> , 2008 Yeşilbağ et <i>al.</i> , 2012 Pratelli et <i>al.</i> , 2014 Rota et <i>al.</i> , 2020
ELISA	Takumi et <i>al.</i> , 1990 Seo et <i>al.</i> , 1994 Reading et <i>al.</i> , 1998 Rijsewijk et <i>al.</i> , 1999 Ronsse et <i>al.</i> , 2002 Ronsse et <i>al.</i> , 2005 Nöthling et <i>al.</i> , 2008 Yeşilbağ et <i>al.</i> , 2012
Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)	Dahlbom et <i>al.</i> , 2009 Krogenæs et <i>al.</i> , 2012 Ström Holst et <i>al.</i> , 2012 Krogenæs et <i>al.</i> , 2014
Immunofluorescence indirecte	Góngora et <i>al.</i> , 2007 Babaei et <i>al.</i> , 2010

2.4.2.2. Diagnostic direct : la virologie

Le diagnostic direct implique la mise en évidence directement du virus ou d'un de ses constituants. Historiquement, lors de sa découverte en 1965, l'effet cytopathogène du virus a été mis en évidence (Carmichael et *al.*, 1965b) sur des cellules canines rénales infectées. Cette technique, impliquant notamment une étape de culture virale est une technique lourde bien que spécifique. D'autres méthodes existent pour mettre en évidence le virus ou une partie de celui-ci. La microscopie électronique (Strandberg et *al.*, 1965), permet d'observer directement des particules virales. Des techniques d'immunomarquages (Li et *al.*, 2016), permettent de mettre en évidence des antigènes viraux par fixation d'anticorps marqués sur ceux-ci. L'hybridation *in situ* (HIS) permet quant à elle la fixation d'une sonde à une séquence nucléotidique spécifique (Schulze et *al.*, 1998) (Larsen et *al.*, 2015) (Molesan et *al.*, 2019). Ceci révèle le génome viral ou ses éléments transcrits au sein de cellules infectées, ce qui permet une localisation du virus au sein de tissus, tout comme l'immunomarquage ou la microscopie électronique.

Une dernière technique largement démocratisée, rapide et simple de réalisation est la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) et notamment la PCR en temps-réel.

2.4.2.2.1. Généralités concernant la PCR en temps-réel

2.4.2.2.1.1. Principe général et définition de la PCR en temps-réel

La PCR classique permet l'amplification de séquences d'ADN. Pour cela, il est primordial de connaître la séquence nucléotidique des deux portions de la séquence d'ADN à amplifier. Ainsi, il est nécessaire d'avoir deux amorces, courtes séquences constituées d'acides nucléiques (environ une vingtaine), complémentaires de chacun des deux brins de l'ADN à amplifier. La réalisation de cette réaction se décompose en 3 grandes étapes. La première, est appelée, étape de « dénaturation ». Elle permet la séparation des deux brins de l'ADN dit « matrice ». S'ensuit une seconde étape, « l'hybridation », correspondant à la fixation des amorces complémentaires à la matrice ADN. Enfin, se déroule une troisième étape, dite « d'élongation », durant laquelle des nucléotides sont ajoutés à partir de l'extrémité 3' des amorces via une ADN polymérase thermostable (le plus souvent la « Taq polymérase »). A l'issue de cette dernière étape, deux nouveaux brins sont formés, un par

amorce fixée. La PCR en temps-réel reprend les principales étapes de la PCR dite classique, avec quelques modifications. Elle est qualifiée de réaction en « temps réel », car elle permet la quantification de la fluorescence émise tout le long de la réaction. Cette fluorescence est proportionnelle au nombre d'amplicons produits. Il existe plusieurs types de PCR en temps-réel. Globalement, deux catégories, développées plus loin, existent, en fonction de la nature du marquage fluorescent utilisé. La première regroupe les PCR en temps-réel mettant en œuvre des agents se liant à l'ADN double brin et émettant un signal fluorescent et la seconde regroupe celles impliquant des sondes, elles aussi, fluorescentes.

2.4.2.2.1.2. Historique de la PCR en temps-réel

La PCR en temps-réel a vu le jour en 1992 lorsque Russell Higuchi et son équipe mettent au point un système permettant la détection des séquences d'ADN amplifiées sans avoir à ouvrir le tube où s'est produit la réaction de polymérisation en chaîne. Pour cela, du bromure d'éthidium est ajouté au mélange réactionnel et joue le rôle d'agent intercalant lors de la PCR en temps-réel. Exposé à des rayonnements ultra-violets, le bromure d'éthidium, intercalé au sein d'ADN double-brin, émet un signal fluorescent, détecté à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device) (Poitras et *al.*, 2002). Ce système permet alors l'obtention de courbes d'amplifications produites au cours de la réaction et non pas uniquement la détection d'un produit d'amplification en fin de réaction, ce qui était le cas avec une réaction de polymérisation en chaîne dite classique. On peut donc, à partir de là, suivre en temps-réel l'accumulation du produit d'amplification.

2.4.2.2.1.3. Concepts et utilités d'une ligne seuil et d'un cycle seuil

Lors d'une réaction PCR, des séquences non spécifiques peuvent être amplifiées et générer un bruit de fond. Afin de distinguer bruit de fond et réelle amplification de la séquence cible par PCR en temps-réel, un seuil de fluorescence est déterminé. La courbe d'amplification lors d'une PCR peut être découpée en 3 phases : une phase linéaire (peu d'amplicons) sous cette ligne seuil, une phase exponentielle (rendement maximal de la PCR en temps-réel) et enfin une phase dite de plateau correspondant à l'épuisement en réactifs, que cela concerne par exemple les amorces ou encore les dNTPs (désoxyribonucléotides triphosphates). La ligne seuil est placée automatiquement par

l'appareil, lorsque la pente de la courbe est linéaire, au moment de la phase exponentielle de la réaction. Elle peut également, si besoin, être modifiée par l'expérimentateur. La fluorescence émise est enregistrée de manière continue par le système informatique qui permet l'automatisation de l'analyse PCR (temps-réel ici). Les données sont enregistrées pour chaque point de la gamme étalon de manière quantitative (quantification), et pour chaque échantillon à tester. L'appareil trace alors des courbes d'amplification qu'il linéarise pour en tirer une valeur caractéristique, appelé cycle seuil ou Cq (threshold cycle). Cette valeur correspond, pour un échantillon donné, au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse le bruit de fond et soit donc synonyme de présence et d'accumulation de l'amplicon. De manière générale, plus la séquence cible à amplifier est présente en quantité importante au début de la réaction, et plus faible sera le nombre de cycles nécessaires pour que l'on puisse voir le signal fluorescent dépasser le bruit de fond, et ce de manière significative (et donc dépasser la ligne seuil) (Poitras et *al.*, 2002) (Gibson et *al.*, 1996). Une comparaison de la valeur Cq obtenue pour un échantillon donné aux valeurs Cq obtenues pour des matrices d'ADN dont la quantité de cible initiale est connue permet l'obtention d'un résultat quantitatif.

2.4.2.2.1.4. Interprétation d'un résultat de PCR en temps-réel

A l'issue de la réalisation d'une PCR temps-réel, que ce soit via la technologie utilisant un intercalant (comme la technique EvaGreen®, 3.1.4.1.2.2.) ou une sonde (comme la technique Taqman, 2.4.2.2.2.), nous obtenons une courbe d'amplification, générée automatiquement par le logiciel de l'appareil utilisé. La Figure 12 est un exemple de courbe d'amplification d'échantillons analysés en PCR temps-réel. Les courbes représentées par les astérisques (*) représentent des courbes d'échantillons positifs. En effet, les courbes d'amplifications dépassent la ligne seuil. De plus les deux courbes (1) ont un Cq inférieur à celui des courbes (2) et (3), ce qui indique que la quantité de cible amplifiable au début de la réaction était plus importante dans les échantillons correspondants aux courbes (1). Les courbes représentées par deux astérisques (**) ne dépassent pas la ligne seuil. Les échantillons correspondants sont par conséquent considérés comme négatifs. En ce qui concerne les PCR temps-réel utilisant des sondes, des courbes similaires sont obtenues de manière générale et sont interprétées de la même manière.

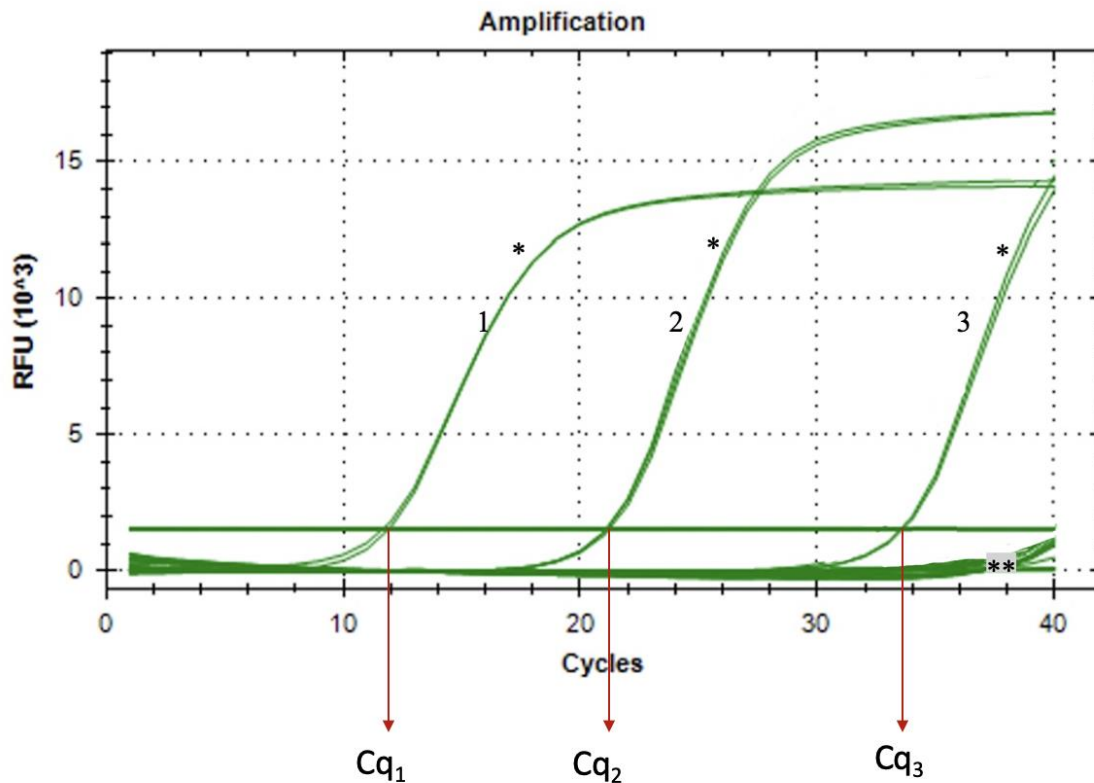


Figure 12: Exemple de courbes d'amplifications obtenues suite à la réalisation d'une PCR temps-réel utilisant un intercalant

En ce qui concerne les PCR temps-réel utilisant des agents intercalants, une étape supplémentaire d'interprétation est nécessaire et sera expliquée par la suite.

2.4.2.2.2. Les différentes techniques PCR utilisées pour détecter le CHV

La PCR permet donc de mettre en évidence le génome viral du CHV et ce de manière quantitative ou non selon la variante de PCR choisie. Ainsi, cette technique est de loin celle la plus utilisée pour mettre en évidence l'ADN du CHV au sein de différents tissus et prélèvements. (Tableau X). Dans le cas du CHV, les amorces utilisées ciblent majoritairement la séquence du gène de la Thymidine Kinase (TK) ou de la glycoprotéine d'enveloppe B (gB) (Tableau X).

Tableau X : Tableau non exhaustif récapitulant les caractéristiques des différentes techniques PCR utilisées au cours des 30 dernières années ainsi que les prélèvements biologiques sur lesquelles elles ont été effectuées

Étude	Technique PCR	Gène cible	Échantillon(s) analysé(s)	Génome CHV détecté ?
Burr et al., 1996	PCR conventionnelle	Glycoprotéine B (gB)	Nœuds lymphatiques trigémínés et lombosacrés, foie, rein, rate, cerveau, poumon, glandes salivaires et amygdales	Oui
			Sang	Non
Schulze et al., 1998	PCR nichée	Thymidine kinase (tk)	Reins, poumons, foie	Oui
Erles et al., 2004	PCR conventionnelle	Glycoprotéine B (gB)	Trachée et poumons	Oui
Ronsse et al., 2005	PCR classique	Glycoprotéine B (gB)	Écouvillons nasaux et vaginaux	Non
			Sang total (buffy coat)	Non
Ledbetter et al., 2009c	PCR en temps réel multiplex	Thymidine kinase (tk)	Écouvillons conjonctivaux bilatéraux	Oui
			Sang total (buffy coat)	Non
Decaro et al., 2010	PCR Taqman en temps réel	Glycoprotéine B (gB)	Dizaines d'organes différents	Oui
Parzefall et al., 2011	PCR classique	Glycoprotéine B (gB)	Labyrinthe vestibulaire, ganglions vestibulaires, ganglions trigémínés	Oui
Ström Holst et al., 2012	PCR en temps réel	Glycoprotéine B (gB)	Écouvillons vaginaux	Non
Larsen et al., 2015	PCR en temps réel semi-quantitative	ADN polymérase du CHV	Foie, poumons, rate et reins	Oui
Monteiro et al., 2016	PCR conventionnelle	Glycoprotéine B (gB)	Écouvillons nasaux	Oui
Piewbang et al., 2017	PCR conventionnelle	Glycoprotéine B (gB)	Écouvillons nasaux et oropharyngés	Oui
			Liquide pleural	Oui

			Écouvillons nasaux, oropharyngés et vaginaux à 7 jours <i>post-partum</i> et à 3 mois <i>post-partum</i>	Oui
			Écouvillons nasaux oropharyngés + épanchements pleuraux	Oui
Molesan et al., 2019	PCR en temps réel	Thymidine kinase (tk)	Myocarde	Oui
Rezaei et al., 2020	PCR en temps réel	Glycoprotéine B (gB)	Utérus	Oui
			Écouvillons vaginaux	Oui
More et al., 2021	PCR quantitative	Glycoprotéine B (gB)	Écouvillons oropharyngés	Oui
Okonkowski et al., 2021	PCR quantitative commerciale IDEXX	Information non disponible	Écouvillons conjonctivaux, nasaux, palatins et amygdaliens	Oui
Castro et al., 2022	PCR nichée	Thymidine kinase (tk)	Écouvillons oculaires, nasaux, préputiaux, vaginaux	Oui
			Sang total	Oui

Ainsi, par exemple, le laboratoire SCANELIS à Toulouse, France, utilise, en routine, une technique de PCR quantitative (qPCR) Taqman avec un couple d'amorces ciblant le gène de la thymidine kinase (tk). Cette méthode repose sur l'hydrolyse d'une sonde hybridée à sa séquence cible présente sur l'amplicon, lors de la phase dite d'élongation. Cette hydrolyse est permise par l'activité 5'-exonucléasique de l'ADN polymérase impliquée dans la réaction, la Taq polymérase. Le fonctionnement de la sonde est le suivant. Un fluorochrome suppresseur, aussi appelé « quencher », placé à l'extrémité 3' de la sonde, inhibe l'émission de fluorescence par un fluorochrome émetteur, dit « reporter », fixé quant à lui à l'extrémité 5' de cette même sonde. La sonde libre n'émet pas ou peu de fluorescence. Durant la phase d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent aux séquences qui leurs sont complémentaires. L'activité de la polymérase débute ensuite l'élongation. Au cours de cette dernière, la sonde est hydrolysée via l'activité 5' exonucléasique de la polymérase, ce qui provoque la séparation du reporter et du quencher. Le reporter n'étant plus inhibé par le fluorochrome suppresseur, l'émission de sa fluorescence n'est plus réprimée. Elle augmente, de façon cumulée, à chaque hydrolyse de sonde lors des différents

cycles. Par conséquent, la fluorescence est proportionnellement corrélée à l'hydrolyse de la sonde par la Taq polymérase et donc au nombre d'amplicons (Figure 13). Le Cq (cycle seuil) reflète une quantité de cible initiale dans l'échantillon.

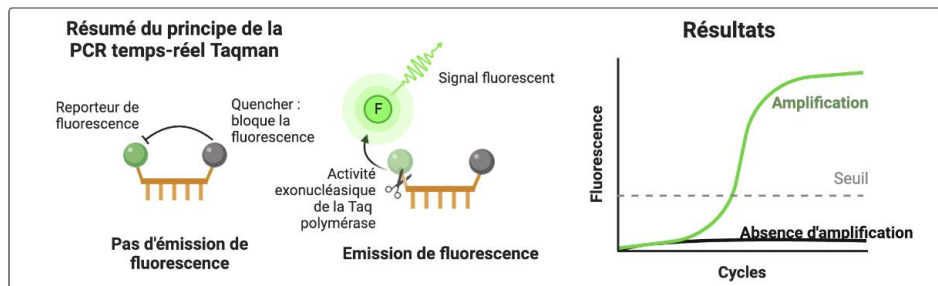
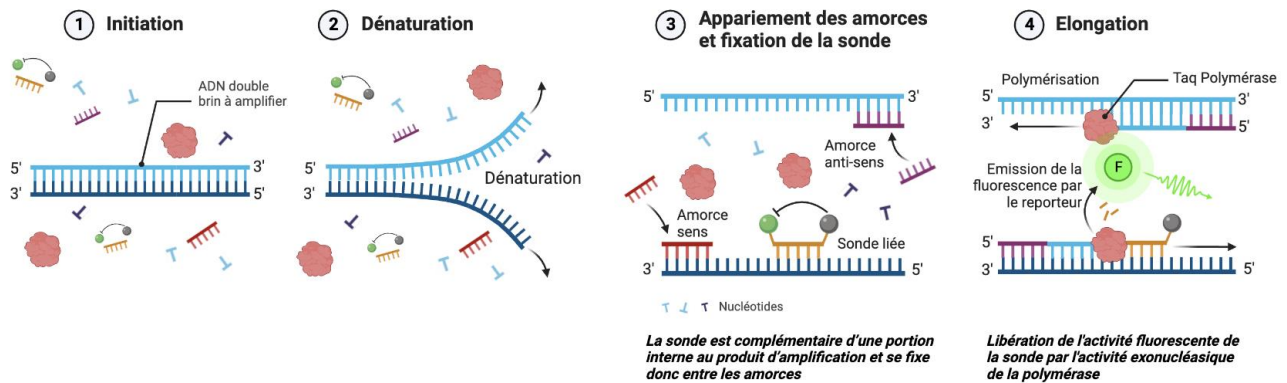


Figure 13 : Principe et principales étapes de fonctionnement de la PCR temps-réel Taqman (créée sur Biorender.com)

Du fait des divers tableaux cliniques possibles suite à une infection par le CHV et la possibilité de latence de celui-ci, le diagnostic par PCR ou par sérologie est parfois compliqué. Il faut alors confronter les signes cliniques, les commémoratifs, l'anamnèse et cibler les échantillons à analyser en fonction des signes cliniques présentés par les animaux. Les Tableaux XI et XII (Fontbonne 2011) permettent une vue d'ensemble des différents prélèvements à réaliser en fonction des situations et des animaux présentés.

Tableau XI : Modalités de gestion des prélèvements en vue de la recherche de CHV par la technique qPCR d'après le laboratoire SCANELIS (Fontbonne 2011)

Indications	Circonstances de l'analyse	Écouvillonnage oro-pharyngé (amygdale)	Écouvillonnage vaginal	Sperme (1 mL)	Organes (non formolés)
Dépistage des reproducteurs	Chienne : pendant les chaleurs, pendant la gestation, après un avortement ou après la mise-bas	X	X	X	
Dépistage des reproducteurs	Chien mâle	X	X	X	
Diagnostic d'infection chez le chiot nouveau-né	Troubles nerveux ou oculo-respiratoires	X			
Diagnostic d'infection chez le chiot nouveau-né	<i>Post-mortem</i>				X Poumons, foie, reins, rate, ganglions

Tableau XII : Tableau récapitulatif des moyens de diagnostic de l'herpèsvirose canine en pratique vétérinaire quotidienne (Legault 2007) (Fontbonne 2011)

Sujet	Période	Prélèvement	Méthode de diagnostic
Chiot nouveau-né	<i>Post-mortem</i>	Reins, rate, foie, poumons	PCR
Chien mâle	Avant un accouplement	Sperme *	PCR
		Sang	Sérologie
Chienne	Avant un accouplement	Sang	Sérologie
		Écouvillon oro-pharyngé et vaginal (de préférence à la fin des chaleurs)	PCR
Chienne	Après un arrêt de gestation constaté à l'échographie (résorption) ou un avortement	Sang	Deux analyses sérologiques à 3 semaines d'intervalle
		Placenta	PCR
Chienne	Après la perte d'une portée	Sang	Deux analyses sérologiques à 3 semaines d'intervalle**
		Écouvillon vaginal	PCR

* Test proposé mais aucune publication ne met formellement en évidence le CHV dans le sperme.

** Deux analyses sont nécessaires car le taux d'anticorps peut être initialement faible à la première prise de sang.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de test rapide à réaliser « au chevet du patient », comme cela peut être le cas avec les tests antigéniques disponibles pour les personnes suspectes d'être atteintes par le COVID-19.

2.4.3. Diagnostic post mortem

2.4.3.1. Lésions macroscopiques

2.4.3.1.1. Chez le chiot de moins de 3 semaines ou les fœtus morts du CHV

L'année de l'identification du CHV chez des chiots morts de septicémie, une description macroscopique des lésions résultant d'une infection mortelle par ce virus est faite. (Carmichael *al.*, 1965a). Elle révèle que chez tous les chiots, les lésions suivantes sont retrouvées (Tableau XIII).

Tableau XIII : Liste des lésions macroscopiques par organes, retrouvées chez tous les chiots de moins de 3 semaines ou fœtus morts du CHV (d'après (Carmichael et *al.*, 1965a)

Organes	Lésions macroscopiques
Poumons	<ul style="list-style-type: none">- Zones grises jusqu'à un centimètre de diamètre, plus fermes que le reste du parenchyme, associées à des zones plus rouges.- Hyperhémie et œdème pulmonaires
Cœur	<ul style="list-style-type: none">- Légère dilatation globale- Dilatations valvulaires- Pétéchies valvulaires et à la surface du cœur
Foie (Figure 16)	<ul style="list-style-type: none">- Moucheté de tâches rouges circonscrites, de 1 à 3 mm de diamètre, à la surface de l'organe et à la coupe
Reins (Figures 14 et 15)	<ul style="list-style-type: none">- Moucheté par des zones hémorragiques et hyperhémiques- Hémorragies sous capsulaires multiples- Zones corticales nécrotiques
Nœuds lymphatiques	<ul style="list-style-type: none">- Adénomégalie
Rate (Figure 17)	<ul style="list-style-type: none">- Splénomégalie- Zones hémorragiques

Autopsie service, ONIRIS



Figure 14 : Photographie d'un rein de chiot mort du CHV à 7 jours d'âge. Visualisation d'un rein moucheté par des zones hémorragiques (Dr Laëticia DORSO, Autopsie-Service, Oniris)

Autopsie service, ONIRIS



Figure 15 : Photographie en coupe longitudinale d'un rein de chiot mort du CHV à 7 jours d'âge. Le cortex présente de nombreuses hémorragies rénales extensives conférant un aspect « marbré » aux reins, associées à des ponctuations blanchâtres, de disposition radiée à la coupe, intéressant à la fois le cortex et la médulla (Dr Laëticia DORSO, Autopsie-Service, Oniris)

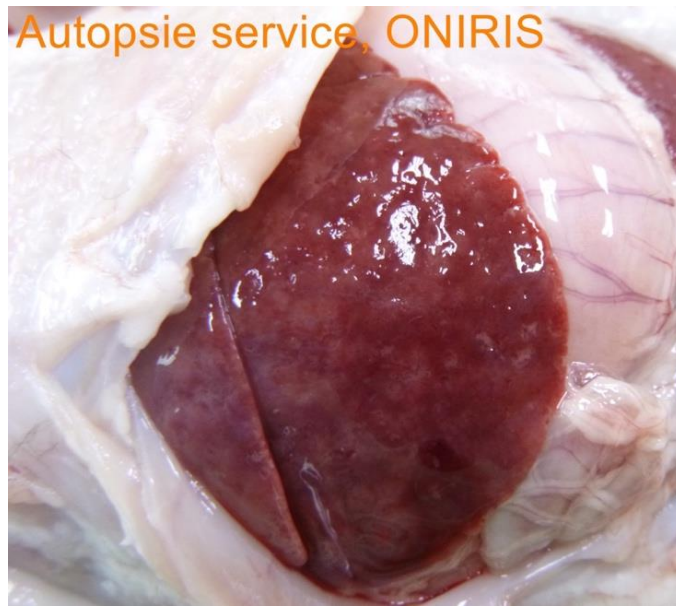


Figure 16 : Visualisation de 2 lobes hépatiques d'un chiot mort du CHV à 7 jours d'âge. Présence de foyers beiges bien délimités compatibles avec des zones de nécrose, parfois coalescents (Dr Laëtitia DORSO, Autopsie-Service, Oniris)



Figure 17 : Rate d'un chiot mort du CHV à 7 jours d'âge. Présence d'innombrables foyers hémorragiques et blanchâtres de 1 à 2 mm de diamètre, disséminés sur l'ensemble du parenchyme splénique (Dr Laëtitia DORSO, Autopsie-Service, Oniris)

D'autres lésions sont constatées, chez une partie seulement des animaux (Tableau XIV).

Tableau XIV : Liste des lésions macroscopiques par organes, retrouvées chez certains des chiots de moins de 3 semaines et des fœtus morts du CHV (d'après Carmichael et al., 1965a)

Organes	Lésions macroscopiques
Peau	Pétéchies sous-cutanées
Plèvre	Hémorragies sous-pleurales
Poumons	Zones focales blanches dans le parenchyme pulmonaire
Intestins	Pétéchies sous-séreuses sur tout le tractus intestinal
Ovaires et utérus	Pétéchies sous-séreuses
Vessie	
Pharynx	Pétéchies

Ce tableau macroscopique a été complété au fil du temps par d'autres examens *post-mortem*. Ainsi, il est décrit qu'un liquide séreux à hémorragique est fréquemment retrouvés dans les cavités péritonéales et pleurales. Un ictère peut, dans de rares cas, être constaté (Greene 2012).

2.4.3.1.2. Chez les adultes atteints du CHV

Comme expliqué précédemment, le CHV-1 est très rarement mortel chez les adultes non immunodéprimés. De plus, lorsque le CHV-1 provoque des troubles respiratoires, il est rarement le seul agent impliqué, ce qui rend les lésions pulmonaires observées non spécifiques de cet agent. Au niveau du placenta de chiennes gestantes ayant transmis le CHV *in utero* à leurs chiots, on peut noter la présence de lésions nécrotiques multifocales. Même si les épisodes de septicémies sont rares chez l'adulte, les lésions décrites chez les chiots ou les fœtus atteints peuvent être observées pour ces individus (Greene 2012).

2.4.3.2. Lésions microscopiques

La lésion microscopique dominant le tableau lésionnel du CHV est la nécrose disséminée qui provoque la destruction des tissus atteints. Cette nécrose est notamment due à des hémorragies

Reins	<ul style="list-style-type: none"> - Gonflement de la capsule de Bowman et infiltration hémorragique - Désorganisation structurale acidophile des tubules et nécrose ischémique - Possible présence glomérulaire de matériel hyalin - Infiltrations intranucléaires le plus souvent basophiles dans les cellules glomérulaires - Dépôts protéiques corticaux et médullaires au niveau et en dehors des zones nécrotiques - Foyers de nécrose périvasculaire marquée avec un léger infiltrat cellulaire 	<p>Carmichael et <i>al.</i>, 1965a</p> <p>Greene 2012</p>
Intestins	<ul style="list-style-type: none"> - Nécrose focale interstitielle - Hémorragie possible de la lamina propria - Foyers de nécrose périvasculaire marquée avec un léger infiltrat cellulaire au niveau de l'intestin grêle 	<p>Carmichael et <i>al.</i>, 1965a</p> <p>Greene 2012</p>
Estomac	<ul style="list-style-type: none"> - Foyers de nécrose périvasculaire légère avec un léger infiltrat cellulaire 	<p>Greene 2012</p>
Pancréas	<ul style="list-style-type: none"> - Hémorragie possible - Foyers de nécrose périvasculaire légère avec un léger infiltrat cellulaire 	<p>Carmichael et <i>al.</i>, 1965a</p> <p>Greene 2012</p>
Nœuds lymphatiques	<ul style="list-style-type: none"> - Présence accrue de lymphoblastes - Hyperplasie réactive faite de cellules phagocytaires 	<p>Carmichael et <i>al.</i>, 1965a</p> <p>Greene 2012</p>
Rate	<ul style="list-style-type: none"> - Erythrophagocytose marquée - Cellules nécrotiques et dégénérées - Foyers de nécrose périvasculaire marquée avec un léger infiltrat cellulaire - Hyperplasie réactive faite de cellules phagocytaires 	<p>Carmichael et <i>al.</i>, 1965a</p> <p>Greene 2012</p>

Cerveau	<ul style="list-style-type: none"> - Foyers de nécrose périvasculaire marquée avec un léger infiltrat cellulaire - Au niveau du tronc cérébral et du cervelet, méningoencéphalite et ganglionévrite non suppurées avec lésions granulomateuses multifocales associées à une prolifération cellulaire périvasculaire 	Greene 2012
Yeux	<ul style="list-style-type: none"> - Œdème rétinien unilatéral et nécrose neuronale - Inclusions intranucléaires dans neurones rétiniens - Infiltration leucocytaire (majoritairement lymphocytaire) dans l'uvée et la rétine 	Carmichael et <i>al.</i> , 1965a
	<ul style="list-style-type: none"> - Dysplasie rétinienne possible - Foyers de nécrose périvasculaire légère avec un léger infiltrat cellulaire dans la rétine 	Greene 2012
Surrénales	<ul style="list-style-type: none"> - Foyers de nécrose périvasculaire légère avec un léger infiltrat cellulaire 	Greene 2012
Placenta	<ul style="list-style-type: none"> - Nécrose multifocale 	Greene 2012
Peau	<ul style="list-style-type: none"> - Vésicules résultant d'une dégénérescence cellulaire par acantholyse 	Greene 2012

2.4.4. Diagnostiques différentiels

Les diverses formes dues au CHV ne provoquent pas de signes pathognomoniques. En effet, plusieurs agents, viraux ou non, peuvent donner des symptômes similaires à l'herpèsvirus canin.

2.4.4.1. Diagnostic différentiel de la forme abortive

Comme expliqué précédemment, le CHV peut provoquer des avortements. Dans l'espèce canine, ces derniers peuvent avoir une étiologie infectieuse ou non. Le Tableau XVI établit une liste non exhaustive des diverses causes abortives chez les chiennes (Poulet 2005). Toutes ces infections sont capables d'engendrer une hyperthermie et capables d'entraîner un avortement. En effet, lors d'un phénomène inflammatoire, des prostaglandines sont synthétisées et peuvent déclencher des contractions utérines pouvant être à l'origine d'une interruption de gestation (Hoarau 1997).

Tableau XVI : Diagnostic différentiel des avortements dans l'espèce canine (Poulet 2005)

Causes infectieuses	Causes non infectieuses
<i>Brucella canis</i> <i>Mycoplasma canis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> Bactéries non spécifiques Parvovirus canin de type 1 (virus minute) Herpesvirus canin de type 1 <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Neosporum caninum</i> Infestation parasitaire	Stress, traumatisme Insuffisance lutéale Déficit nutritionnel Origine iatrogène ou toxique Anomalies

2.4.4.2. Diagnostic différentiel de la mortalité néonatale

Les troubles de la reproduction ne se traduisent pas seulement par des avortements mais également par de la mortalité néonatale. Comme pour les avortements, les causes sont multiples. Les principales étiologies sont répertoriées dans le Tableau XVII (Poulet 2005).

Tableau XVII : Diagnostic différentiel de la mortinatalité dans l'espèce canine (Poulet 2005)

Causes infectieuses	Causes non infectieuses
Herpèsvirus canin de type 1 Parvovirus canin de type 1 (virus minute) Parvovirus canin de type 2 Maladie de Carré Adénovirus canin de type 1 <i>Mycoplasma canis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> Bactéries non spécifiques <i>Toxoplasma gondii</i>	Malformations Syndrome du dépérissement du chiot Syndrome du lait toxique Traumatisme Intoxication

2.4.4.3. Diagnostic différentiel de la forme respiratoire

Le CHV agit le plus souvent au sein d'une « association de malfaiteurs » dans le syndrome de la toux du chénil. Le diagnostic différentiel de la forme respiratoire de l'herpèsvirus canin comprend donc les principaux agents intervenants dans la toux du chénil. Parmi ceux-ci, on peut noter, entre autres, l'Adénovirus Canin de type 2, le virus Parainfluenza canin, des Réovirus canins, *Bordetella bronchiseptica* ou encore *Mycoplasma spp* (Decaro et al., 2008).

2.4.4.4. Diagnostic différentiel des formes génitales

Chez la femelle, les lésions papulo-vésiculaires induites par le CHV peuvent être confondues avec celles provoquées par une tumeur maligne vénérienne : le sarcome de Sticker (plus fréquent dans les pays du bassin méditerranéen).

Chez le mâle, l'inflammation génitale provoquée par le virus peut être confondue avec des balanoposthites d'étiologies diverses comme : des agents opportunistes, *E.Coli*, *Mycoplasma canis* ou encore des Calicivirus (Parkinson 2019).

2.4.4.5. Diagnostic différentiel de la forme oculaire

Les formes oculaires étant extrêmement variées au niveau symptomatologique (kératite, ulcère, conjonctivite, blépharospasme ...), le diagnostic différentiel est extrêmement large.

2.5. Traitement et prophylaxie

2.5.1. Traitements des diverses formes du CHV

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement spécifique pour des animaux touchés par l'herpèsvirose canine. Les formes génitales et respiratoires, rencontrées en grande majorité chez les adultes, sont traitées de manière symptomatique.

En ce qui concerne les atteintes oculaires dues au CHV, plusieurs antiviraux ont néanmoins été testés. Les formes les plus graves et les plus compliquées à gérer sont les formes néonatales systémiques. Pour cela, des traitements à base d'antiviraux, d'immuns sérums ou encore de lactoferrine ont été testés (Tableau XVIII).

D'autres pistes sont actuellement explorées avant de traiter les animaux atteints du CHV. Récemment, une étude a démontré que l'administration par voies orale et intranasale d'une solution de complexes liposomes-TLR (Toll-Like Receptor), constituée de liposomes contenant des agonistes TLR 9 et 3 activant spécifiquement les défenses immunitaires des muqueuses était efficace contre le CHV. En effet, les animaux présentant des signes cliniques consécutifs à une infection au CHV n'avaient plus de signes de la maladie 13 jours en moyenne après l'administration du traitement, ce qui n'est pas le cas du groupe ayant reçu un placebo pour qui les animaux présentaient toujours des signes 40 jours après le début de l'étude (Wheat et *al.*, 2019).

Tableau XVIII : Liste non exhaustive des principaux traitements testés et ayant obtenus des résultats dans le traitement d'affections dues au CHV

Atteinte	Molécule utilisée, posologie, voie d'administration, durée du traitement	Mode d'action	Résultat(s) obtenus	Source(s)
Forme respiratoire (adultes)	Pas de traitement antiviral spécifique. Traitement symptomatique et gestion des surinfections			Evermann et <i>al.</i> , 2011
Forme génitale (adultes)				
Forme oculaire : kératite herpétique dendritique (adultes)	Cidofovir 0,5%, BID*, IO**, 14 j	Inhibition d'ADN polymérase virales	Résolution de l'ulcération dendritique et amélioration des signes cliniques locaux en 7 jours	Gervais et <i>al.</i> , 2012

Forme oculaire : kératite herpétique dendritique (adultes)	Ganciclovir 0,15% , 1 goutte IO 5/j pendant 7j puis 3/j pendant 7j	Analogue nucléosidique inhibiteur de la réplication virale une fois triphosphorylé	Diminution des signes cliniques oculaires dont de l'inflammation et réduction de l'excrétion virale oculaire du CHV	Ledbetter et <i>al.</i> , 2018
	Trifluridine 1% , IO 6/j pendant 2j puis 4/J pendant 14j	Analogue nucléosidique qui interfère avec la réplication de l'ADN des herpèsvirus.	Diminution des signes cliniques oculaires et réduction de l'excrétion virale oculaire du CHV. Administration fréquente nécessaire.	Spertus et <i>al.</i> , 2016
Atteinte systémique (chiots)	Acyclovir : 7 à 10mg PO*** 4/j jusqu'à 3,5 semaines d'âge	Analogue nucléosidique qui interfère avec la réplication de l'ADN des herpèsvirus.	Survie des chiots mais possibles séquelles sur le myocarde et le système nerveux central	Greene 2012
	Vidarabine 3% , IO, 4 à 6 fois par jour, durée inconnue	Analogue de l'adénosine. Inhibiteur de la réplication d'ADN viral	Survie de tous les chiots symptomatiques du CHV	Greene 2012
	Lactoferrine , PO, posologie et durée non déterminées (traitement empirique)	Protéine fixant le fer se trouvant dans les sécrétions de mammifères et notamment dans le lait	Inhibition de l'attachement viral du CHV aux cellules de l'hôte	Tanaka et <i>al.</i> , 2003

Atteinte systémique (chiots)	Immun-sérum de chiennes ayant récemment donné naissance à des chiots morts du CHV-1 injection unique de 1 à 2 mL en IP****	Sérum avec anticorps dirigés contre le CHV-1	Réduction des pertes dans les portées. Réussite dépendante du niveau d'anticorps dans le sérum et de la précocité d'administration. Persistance des signes neurologiques si administration du sérum après leur apparition.	Greene 2012
-------------------------------------	---	--	--	-------------

* BID : toutes les 12h

** IO : voie intraoculaire

*** PO : voie orale

**** IP : voie intrapéritonéale

2.5.2. Prophylaxie médicale : la vaccination

En 2001, un vaccin, le seul sur le marché pour le moment, a été mis au point et est toujours actuellement commercialisé : EURICAN® Herpes 205 ("EURICAN® Herpes 205 Poudre et Solvant Pour Émulsion Injectable"). Une autorisation de mise sur le marché concernant tous les pays de l'Union Européenne a été obtenue pour ce vaccin le 26 mars 2001. Ses caractéristiques sont résumées dans le Tableau XIX. Le CHV affecte les chiots *in utero* et en période néonatale immédiate ce qui rend une immunisation active impossible, les chiots n'ayant pas le temps ni les capacités de fabriquer des anticorps. L'immunisation passive induite par la vaccination des mères permet de réduire la mortalité des chiots exposés au CHV (Greene 2012). Le risque d'entrée en latence du virus n'étant pas négligeable, l'utilisation d'un vaccin vivant atténué n'est pas permise, d'où le fait que le vaccin disponible soit un vaccin sous-unité. Une première injection est recommandée une semaine à 10 jours post saillie/insémination artificielle et 1 à 2 semaines avant la date prévue de mise-bas. Cette seconde injection est justifiée par le fait que le virus est peu immunogène et que les titres en anticorps neutralisants diminuent rapidement. Injecter une dose de vaccin une seconde fois, en fin

de gestation permet un titre en anticorps suffisant, dont une partie pourra notamment être transférée aux chiots lors de la prise de colostrum (Appel 1987).

Tableau XIX : Résumé des caractéristiques du vaccin « Eurican Herpes 205® » d'après son RCP

Exploitant et titulaire de l'autorisation de mise sur le marché	Boehringer Ingelheim ALLEMAGNE
Animaux cibles	Chiennes gestantes
Voie d'administration du vaccin	Sous-cutanée
Type de vaccin	Vaccin purifié sous-unités
Utilisation et posologie une fois reconstitué (poudre + solvant)	<ul style="list-style-type: none"> - 1^{ère} injection : 7 à 10 jours post saillie - 2^{ème} injection : 7 à 14 jours avant date prévue de mise-bas - Rappel : à chaque gestation selon le même schéma vaccinal.
Composition et principes actifs	<ul style="list-style-type: none"> - Principe actif : antigènes du CHV (souche F205) : 0,3 à 1,75 µg de glycoprotéine gB - Adjuvant : huile légère de paraffine
Conservation	<ul style="list-style-type: none"> - Au réfrigérateur (2-8°C) - A l'abri de la lumière
Propriétés d'après le fabricant	« Vaccin purifié à sous-unités pour l'immunisation active des chiennes gestantes afin d'induire une protection passive des chiots contre la maladie néonatale fatale due à l'herpèsvirus canin »
Mises en garde	Possibilités : <ul style="list-style-type: none"> - D'avortements spontanés - De mises-bas prématurée
Effets indésirables possibles	<ul style="list-style-type: none"> - Œdème transitoire au niveau du site d'injection (1 à 10 animaux sur 100) - Rares réactions d'hypersensibilité (1 à 10 animaux sur 10 000)

Actuellement, il n'existe aucune autre méthode de prophylaxie médicale fiable et utilisable à grande échelle contre le CHV. Des essais d'induction de paraimmunisation par des Poxvirus ont été réalisés (Mayr et al., 1999) mais ce procédé n'est pas actuellement utilisé. Empiriquement, certains éleveurs

vaccinent des chiennes avec le vaccin anti FHV (herpèsvirus du chat) dans l'espoir que des anticorps produits en réaction à cette injection puissent aider à protéger les individus contre le CHV. Cependant, à ce jour, il a seulement été montré que les anticorps anti-CHV peuvent se fixer sur les antigènes de l'herpèsvirus félin et non l'inverse (Xuan et *al.*, 1992).

2.5.3. Prophylaxie sanitaire

2.5.3.1. L'hygiène

Un lien a été mis en évidence entre mauvaise hygiène environnementale et titres élevés en anticorps anti-CHV (Ronsse et *al.*, 2004). L'hygiène des locaux où sont hébergés les chiens est donc primordiale dans la prévention de la contamination des animaux par le CHV. Comme indiqué dans le paragraphe 2.1.7., le virus est fragile dans l'environnement et sensible à de nombreux détergents. Une désinfection régulière et rigoureuse des locaux et du matériel couramment utilisé avec ces produits est donc une manière efficace et relativement simple de diminuer grandement la pression d'infection virale dans l'environnement.

2.5.3.2. La zootechnie

La forme la plus à craindre du CHV est la forme systémique néonatale. L'objectif principal est donc d'éviter que les nouveau-nés ne se retrouvent contaminés par le virus. Pour cela, plusieurs axes sont envisageables. Tout d'abord, la réalisation d'analyses sur des prélèvements effectués sur des animaux sur le point d'intégrer un élevage est une possibilité, afin, par exemple, de détecter la présence du virus (s'il est excrété au moment du prélèvement) ou des traces de son passage (anticorps neutralisants chez un animal non vacciné contre le CHV). De plus, on sait que le stress, notamment chez les chiennes en gestation, peut provoquer une sortie de latence du virus (Decaro et *al.*, 2008). Une gestion des chiennes lors de la gestation avec le moins d'éléments stressants possibles est à envisager. Il a en effet été démontré une recrudescence du virus latent chez des chiennes séropositives après exposition stressante à des jeunes animaux séronégatifs (Greene 2012). Peu d'études ont évalué l'intérêt d'une césarienne ou d'une insémination artificielle dans la

diminution du risque de transmission du virus (Greene 2012). Enfin, séparer les chiots de la mère à la naissance permettrait de diminuer la probabilité de contamination oro-nasale si un doute existe quant au statut excréteur ou non de la mère.

2.5.3.3. Le traitement thermique des chiots

Un axe majeur prophylactique contre le CHV est le traitement thermique des chiots. Par le passé, diverses études ont mis en évidence le fait que la croissance du CHV est température-dépendante. En effet, la température d'incubation est déterminante dans la production massive du CHV par les cellules infectées, et cette dernière est maximale à 37°C (Aurelian 1969) (Lust et *al.*, 1971). A 39°C, le titre viral maximal est de seulement 2 % du titre viral obtenu à une température de 37°C (Aurelian 1969). D'autres expériences ont montré que le rendement viral à 40°C ne représente qu'environ 1 % de celui obtenu à 36°C (Lust et *al.*, 1971). Cette même étude suggère que la formation du CHV est fortement inhibée à 40°C, d'une part à cause d'une diminution de la synthèse des protéines et de l'ADN viral et, d'autre part, à cause d'un dérèglement de la maturation des virions. Globalement, la croissance du CHV optimale entre 35 et 37 °C diminue en deçà ou au-delà (Aurelian 1969) (Huxsoll et *al.*, 1970) (Carmichael et *al.*, 1969c) (Carmichael et *al.*, 1969a). A la naissance et au cours des deux premières semaines de vie d'un chiot, la température rectale de ce dernier est en dessous de celle d'un chien adulte et se trouve aux alentours de 35,6 °C ± 1°C, pour atteindre progressivement 38°C, une semaine après (Crighton 2008). Durant les deux premières semaines de vie, un chiot a une température corporelle inférieure à 39°C et n'est pas homéotherme, ce qui implique qu'il a une température corporelle proche de celle jugée optimale pour le développement du CHV (Huxsoll et *al.*, 1970). Des expériences d'inoculation virale ont montré que la survie de chiots nouveau-nés inoculés à la naissance est meilleure et que la croissance virale est fortement réduite lorsqu'ils sont dans un environnement qui permet de maintenir une température corporelle entre 38,6 et 39,4° (Carmichael et *al.*, 1969b). Cette même étude a également mis en évidence que des animaux âgés de 4 à 8 semaines, normalement résistants au CHV, ont présenté des lésions microscopiques sur divers organes sur lesquels le CHV a été isolé alors qu'ils ont été soumis à une baisse de leur température corporelle. Ceci n'a pas été le cas chez des animaux du même âge mais normothermes, également inoculés avec le CHV.

La température corporelle du chiot dans ses 2 à 3 premières semaines de vie semble donc être un facteur déterminant du développement du CHV. C'est pourquoi la mise en couveuse ou encore l'utilisation de lampes chauffantes (Greene 2012), semblent être une option intéressante à la naissance des chiots, afin de limiter le risque de multiplication du CHV, tout en veillant à ne pas déshydrater les chiots.

TROISIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Objectifs :

Les objectifs de ce travail sont multiples et concourent à la mise en évidence du CHV dans la population canine, notamment chez les reproducteurs.

Tout d'abord, le premier objectif est de contribuer modestement à l'état des lieux de la présence du CHV au sein d'une population de chiens reproducteurs dans la région nantaise et en Normandie. En effet, en France, la dernière étude sérologique de terrain sur le territoire français remonte, à notre connaissance, à 2002 (Guigal et *al.*, 2002). Nous n'avons pas trouvé d'étude prospective recherchant la présence du virus par PCR en temps-réel sur des prélèvements sanguins et intéressant également la sphère génitale en France. Ce travail permet donc d'avoir une idée de la prévalence de ce virus sur un nombre modéré d'individus. De plus, nous n'avons pas trouvé, dans la littérature scientifique, d'article relatant la présence d'ADN correspondant à celui du CHV dans le sperme de chien (Quartuccio et *al.*, 2020).

Le second objectif de ce travail est d'identifier d'éventuels facteurs favorisant chez des animaux qui seraient positifs au CHV au cours de notre étude et d'en déduire des mesures prophylactiques, applicables en élevage.

Enfin, le troisième objectif majeur de cette thèse est de tester une nouvelle amorce mise au point pour cette étude et de l'utiliser via la technique PCR en temps-réel EvaGreen® afin de voir si elle permet, à moindre coût, d'obtenir les mêmes résultats qu'une technique en théorie plus sensible mais plus coûteuse, la qPCR (PCR quantitative) Taqman. Nous avons, choisi de comparer différents tests PCR en temps-réel, publiés ou mis au point pour ce travail, ce qui n'a été que rarement publié.

3.1. Matériel et méthode

3.1.1. Animaux et échantillons testés lors de cette étude

3.1.1.1. Prélèvements biologiques

3.1.1.1.1. Provenances des animaux intégrés à l'étude

Nous avons pu prélever en tout 75 femelles et 18 mâles pour cette étude, ce qui représente 93 patients canins. Les prélèvements biologiques (sangs totaux sur tubes EDTA et tubes secs, écouvillons vaginaux, écouvillons préputiaux et spermes), ont été collectés entre octobre 2021 et mai 2022, sur des animaux d'éleveurs canins du grand ouest, au sein du Centre Hospitalier Vétérinaire ONIRIS à Nantes, directement auprès d'élevages travaillant avec ce centre Hospitalier. Des prélèvements ont également été effectués sur des animaux reproducteurs, d'élevages normands. Afin de réaliser ces prélèvements dans les meilleures conditions et dans le but de respecter au maximum le bien-être des animaux, un dossier CERVO (Comité d'éthique en recherche clinique et épidémiologique vétérinaire d'Oniris) a été soumis pour ce travail sur le CHV et accepté (numéro de validation éthique CERVO-2021-28-V). Des consentements éclairés accompagnés d'explications concernant les objectifs des prélèvements ont été fournis aux éleveurs souhaitant participer à l'étude (Annexes 1 et 2).

3.1.1.1.2. Conditions de réalisation des prélèvements

3.1.1.1.2.1. Prélèvements sanguins

Du sang a été prélevé sur chaque animal, à raison de 3 mL au total par individu. Un millilitre a été prélevé et placé dans un tube EDTA afin de pouvoir réaliser une extraction d'ADN sur sang total et y effectuer une recherche d'ADN viral par PCR en temps-réel. Les deux autres millilitres ont été collectés sur tube sec afin d'en récupérer le sérum, après centrifugation, pour analyse sérologique dans le but d'obtenir des titres en anticorps anti-CHV.

Ces prélèvements sanguins ont été effectués par ponction d'une veine jugulaire ou céphalique (en fonction du caractère et de la contention de l'animal), après une tonte de la zone à ponctionner (lorsque que l'éleveur était d'accord) et passage d'alcool à 70°C.

Le tube EDTA est immédiatement placé à -20°C après étiquetage tandis que le tube sec est laissé à température ambiante pendant maximum 2 heures, puis centrifugé à 1500 g pendant 10 minutes. Le sérum est alors prélevé et placé dans un tube sec préalablement identifié, congelé lui aussi à -20°C, dans l'attente d'un envoi groupé au laboratoire SCANELIS, Toulouse qui travaille avec un laboratoire réalisant des sérologies CHV.

3.1.1.1.2.2. Écouvillons vaginaux

Afin de récupérer des cellules vaginales, un écouvillonnage à l'aide d'une cytobrosse stérile a été effectué. Deux écouvillons par femelle ont été réalisés : un pour nos analyses PCR en temps réel et un pour envoi en analyse externalisée dans un laboratoire de référence, SCANELIS, à Toulouse, réalisant des qPCR CHV. Pour cela, et afin de respecter l'anatomie et la conformation vaginales de la chienne, l'écouvillon est d'abord introduit verticalement après traction de la partie ventrale de la vulve à l'aide d'un gant en latex, afin d'éviter la fosse clitoridienne. La cytobrosse est ensuite réorientée horizontalement une fois le plafond vaginal atteint, dans le but de se rapprocher au maximum du col utérin. Des rotations de la brosse sont alors effectuées 4 à 5 fois afin de maximiser les chances de récupérer des cellules épithéliales. Les deux écouvillons sont chacun placés individuellement dans des tubes secs et congelés à -20°C, dans l'attente d'extraction du matériel génétique.

3.1.1.1.2.3. Écouvillons préputiaux

Afin de récupérer des cellules préputiales, un écouvillonnage à l'aide d'une cytobrosse stérile a été effectué. Deux écouvillons par mâle ont été réalisés : un pour nos analyses PCR en temps-réel et un pour envoi en laboratoire réalisant des qPCR CHV, tout comme pour les écouvillons vaginaux.

Pour cela, l'écouvillon est introduit entre la verge et la muqueuse préputiale du chien à prélever. Des rotations de la brosse sont alors effectuées 4 à 5 fois afin de maximiser les chances de récupérer du matériel génétique, notamment via la récolte de cellules épithéliales. Les deux écouvillons sont

chacun placés individuellement dans des tubes secs et congelés à -20°C, dans l'attente d'extraction du matériel génétique.

3.1.1.1.2.4. Spermes

Avant tout prélèvement, le chien est placé dans l'environnement le plus calme possible. Quand cela est possible, une femelle en chaleur est placée face au mâle lors du prélèvement.

Les prélèvements sont tous effectués à l'aide d'un vagin artificiel. Ce dernier est un cône en caoutchouc propre, chauffé préalablement à 37°C afin de préserver la semence, et de se rapprocher le plus possible des caractéristiques d'un vagin de la chienne. Au cours du prélèvement, un tube stérile est placé à l'autre extrémité du cône afin de récupérer stérilement le sperme du mâle. Enfin, après le prélèvement le chien est isolé de la femelle pour que les bulbes érectiles dégonflent et, dans le cas où après 10 minutes le pénis ne serait pas remis en position physiologique, celui-ci est replacé dans le fourreau. Une fois la manipulation terminée, le tube stérile est congelé à -20°C, dans l'attente d'extraction du matériel génétique.

3.1.1.1.2.5. Organes

Dans le cadre de cette étude, nous avons pu récupérer, avec l'accord de l'éleveur, le chiot mort de la femelle F-070 dans ses 12 premières heures de vie. Nous avons donc décidé de saisir cette opportunité et de prélever différents organes dans le but de les tester en PCR temps-réel à la recherche de l'ADN du CHV. Notons qu'à l'examen *post-mortem*, une congestion généralisée était présente, sans autre anomalie remarquable, qui aurait pu être évocatrice d'une infection par CHV. A l'aide d'instruments stériles de chirurgie, nous avons réalisé la dissection des différents organes du chiot, pour prélever et placer dans des tubes Eppendorf, environ 3 mm³ de chaque organe. Nous avons ainsi pu récupérer des morceaux de : poumons, rate, reins, foie, nœud lymphatique mésentérique, nœud lymphatique lombo-sacré. Suite à cela, nous avons utilisé un disperseur-homogénéiseur industriel, l'Ultra-Turrax®, afin d'obtenir une suspension liquide de chaque organe. Une fois cette étape réalisée, nous avons congelé les différentes suspensions à -80°C dans l'attente de l'extraction ADN préalable aux analyses PCR.

3.1.2. Cultures cellulaires de cellules MDCK infectées

Des cellules MDCK (MDCK, ATCC® CCL-34™) ont été cultivées et infectées lors de la thèse de Doctorat Vétérinaire de la Docteure Mélissa MAURIERE en 2019 (Maurière 2019). Elles ont été contaminées avec une souche d'herpèsvirus canin, la souche « DK13 », conservée congelée à -80°C au service de Biotechnologie et Pathologie de la Reproduction d'ONIRIS (École Nationale Vétérinaire de Nantes), depuis l'année 2009. Nous avons pu utiliser diverses dilutions de l'ADN de ces cellules, ce qui nous a permis d'avoir à notre disposition des concentrations différentes d'ADN canin contaminé par l'ADN viral du CHV. Nous avons également utilisé une solution contenant de l'ADN de cellules MDCK non contaminées par le CHV, afin d'avoir un témoin négatif. Au final, nous avons à disposition des solutions d'ADN de cellules de MDCK contaminé par de l'ADN de CHV à des concentrations allant de $150 \cdot 10^{-1}$ à $150 \cdot 10^{-9}$ ng/ μ L.

3.1.3. EXTRACTIONS ADN DES ECHANTILLONS

3.1.3.1. Principe général des extractions d'ADN

Pour cette thèse, globalement, le but des extractions d'ADN est de lyser les cellules sanguines, vaginales, préputiales, spermatiques et des organes collectés, afin d'en récupérer le matériel génétique. Cette lyse est obtenue consécutivement à l'incubation de l'échantillon dans un liquide contenant de la protéinase K (enzyme de digestion des protéines) et l'ajout de divers tampons. Des membranes constituées de silices et montées sur des colonnes adaptées permettent la liaison de l'ADN que l'on souhaite extraire par l'ajout de sels chaotropiques et d'éthanol au lysat obtenu. Ce processus de liaison est réversible et spécifique aux acides nucléiques. Normalement, les diverses contaminations de l'ADN sont éliminées par un lavage avec deux tampons différents. L'élution de l'ADN génomique purifié extrait est permise via l'utilisation d'un tampon d'élution légèrement alcalin.

3.1.3.2. Protocoles d'extractions utilisés selon les types de prélèvements

Ne sachant pas si le virus est présent dans le sperme et donc dans quelle phase il peut se trouver, nous avons décidé, avant extraction, de séparer les phases cellulaire et liquidienne selon le protocole présenté en Annexe 3. Hormis la phase liquidienne du sperme des mâles prélevés, les cellules préputiales, vaginales, sanguines et spermatiques ont été prélevées en utilisant le kit d'extraction *NucleoSpin® Tissue* de Macherey-Nagel™. C'est également le cas pour l'extraction d'ADN d'organes après broyage à l'Ultra-Turrax®, que l'on souhaite tester. Le protocole utilisé pour extraire l'ADN des cellules vaginales et préputiales est inspiré de celui fourni par le fabricant pour traiter les écouillons buccaux et figure en Annexe 4. Celui utilisé pour extraire les cellules sanguines est adapté à partir de celui fourni dans le kit pour extraire de l'ADN génomique sanguin (Annexe 5). De même, le protocole d'extraction utilisé dans le cadre de cette thèse pour récupérer l'ADN des cellules présentes dans les spermatozoïdes à analyser est largement inspiré du protocole fourni dans le kit pour extraire l'ADN de cultures cellulaires et de tissus (Annexe 6). Le protocole d'extraction d'ADN provenant d'un organe est inspiré du même protocole.

En ce qui concerne la phase liquidienne du sperme, et en partant du principe que celle-ci ne contient pas de cellule canine, nous avons utilisé le kit *NucleoSpin® RNA Virus* de Macherey-Nagel™ afin de maximiser les chances de récupérer du matériel génétique viral. Pour cela, nous avons utilisé un protocole largement inspiré de celui fourni par le fabricant pour l'isolement d'ARN et d'ADN viraux à partir de liquides biologiques acellulaires (Annexe 7).

3.1.3.3. Mesures des concentrations en ADN une fois les échantillons extraits et interprétation des valeurs obtenues

Une fois l'ADN de chaque échantillon à analyser extrait, une mesure de la qualité et de la concentration (ng/μL), est nécessaire afin de s'assurer de la bonne réalisation de l'étape d'extraction. En effet, une concentration en ADN nulle ou très faible implique l'ajout d'une matrice très pauvre au mix de PCR, ce qui rend très improbable l'amplification d'une séquence ADN pouvant correspondre à celle d'une souche virale du CHV. Dans le cadre de ce travail, l'appareil utilisé est le Nanodrop2000™ de la marque Thermo Fisher Scientific™. Ce dosage est possible grâce à la technique de spectrophotométrie UV. 1 μL de l'échantillon à doser est déposé sur la plateforme

dédiée. Ce dernier va être traversé par différentes longueurs d'ondes (230, 260 et 280 nm) et l'absorbance (A) correspondante est déterminée, grâce, en particulier, à la relation de Beer Lambert : $A = \epsilon \times l \times c$ (ϵ = coefficient d'extinction molaire ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l = longueur du trajet optique (cm), c = concentration molaire de l'échantillon (mol.L^{-1})). L'appareil permet également la détermination des rapports d'absorbances : A260/A280 et A260/A230 (avec XYZ = absorbance à la longueur d'onde XYZ). Les rapports A260/A280 et A260/A230 déterminés par l'appareil permettent d'apprécier le niveau de pureté en ADN de l'échantillon en cours de dosage. Le rapport A260/A280 doit être conventionnellement compris entre 1,8 et 2,0 et le plus proche possible de 1,8. L'absorbance à 260 nm correspond à l'absorbance des bases azotées de l'ADN tandis que l'absorbance à 280 nm correspond à celles d'acides aminés aromatiques. Une contamination par des éléments protéiques se traduit par un rapport inférieur à 1,8 tandis qu'un rapport supérieur à 2 indique une contamination par de l'ARN ou une contamination par un composé phénolé. Le rapport A260/A230 est un second élément permettant d'évaluer la pureté d'un échantillon d'ADN. Il doit être compris entre 2,0 et 2,2. La plupart des contaminants tels que des composés phénolés, utilisés lors des extractions, absorbent à une longueur d'onde de 230 nm. Une valeur inférieure à 2,0 traduit la présence de ce type de contaminant. Au contraire, une valeur supérieure à 2,2 semble indiquer un problème de mesure à « blanc ». Les échantillons pour lesquels les rapports A260/A280 et A260/A230 n'étaient pas compris dans l'intervalle de valeurs souhaité sont signalés en par des cases grisées dans les tableaux des résultats des extractions (3.2.2.).

3.1.4. Les différentes méthodes PCR et tests utilisés

Nous avons utilisé, pour nos manipulations au sein de l'école, des techniques de PCR en temps-réel. Les PCR réalisées à l'extérieur de l'école ont quant à elles été réalisées de manière quantitative par le laboratoire SCANELIS.

3.1.4.1. PCR en temps réel

Souhaitant détecter la présence ou non d'ADN CHV au sein de nos échantillons, nous n'avons pas été jusqu'à l'étape de quantification réelle. Néanmoins, en réalisant des dilutions en série d'ADN de cellules MDCK infectées, nous pouvons de façon relative caractériser nos échantillons en considérant le Cq. Si ce dernier est faible on peut considérer que la quantité de virus initiale est

importante ou, au contraire, qu'elle est faible si le Cq est élevé (tout en étant inférieur au seuil défini).

3.1.4.1.1. Travail préalable à la réalisation de nos PCR en temps réel et choix des tests utilisés en interne à ONIRIS

3.1.4.1.1.1. Choix des tests PCR temps réel à comparer

Un des objectifs spécifiques de ce travail est de disposer d'un test très sensible et spécifique de détection de l'herpèsvirus canin, en particulier au niveau de l'appareil génital des chiens mâles et femelles. Une sérologie positive n'est pas systématiquement synonyme de présence effective du virus chez un individu donné, notamment à cause de possibles réactions croisées avec des anticorps vaccinaux, à la faible persistance dans le temps des anticorps produits lors du passage du virus ou encore à la possibilité de faux négatifs. C'est pour cela que la PCR (en temps-réel dans cette étude) semble incontournable car elle détecte directement le génome viral. Nous avons donc souhaité la mise en place d'une technique PCR en temps-réel qui puissent être appliquée valablement (et à coût limité si possible) dans des étapes de criblages de prélèvements réalisés sur le terrain. Une fois mise au point, le but est d'utiliser une telle technique de biologie moléculaire, comme moyen efficace de détection du virus et de pouvoir en déduire des applications concrètes en matière de prophylaxie en élevage.

Pour cela, nous avons passé en revue les publications utilisant une technique PCR quantitative ou en temps réel et avons trouvé quelques tests particulièrement intéressants. Malheureusement, ces tests ne sont pas ou très peu comparés entre eux en termes de sensibilité et de spécificité. C'est le cas de ceux de l'équipe d'Eric Ledbetter (Ledbetter et *al.*, 2009c) et de l'équipe de Nicola Decaro (Decaro et *al.*, 2010), que nous avons retenus comme étant des tests de référence publiés.

Ceci avait déjà conduit, en 2019, à la mise au point d'un test Taqman, qui s'est avéré moins sensible qu'un autre test publié par Eric Ledbetter et son équipe (Maurière 2019). Ce test, utilisé sur 18 éjaculats de 13 chiens différents, n'a pas permis la mise en évidence du virus lors de l'étude. Nous avons donc également décidé, dans le cadre de ce travail de revenir sur ce problème de définition et de choix d'un test efficace et moins coûteux que la technologie Taqman tout en restant très sensible.

Globalement, nous avons donc retenu et comparé 5 tests entre eux et ce pour la première fois ; les deux tests publiés cités précédemment, le test de Mélissa Maurière et deux tests que nous avons conçus pour ce travail.

3.1.4.1.1.2. Mise en œuvre de la comparaison des tests PCR en temps réel retenus

Les tests comparés au cours de ce travail sont : le test Taqman établi par l'équipe d'Eric Ledbetter en 2009 (Ledbetter et *al.*, 2009c), le test Taqman mis en place par l'équipe de Nicola Decaro en 2010, le test Taqman mis au point par la Docteure Mélissa Maurière en 2019 et le Professeur François Meurens (Maurière 2019) et 2 tests « maison » EvaGreen® mis au point à Oniris en 2021 avec l'aide du Professeur Lionel Martignat dans le cadre de ce travail (Tableau XX).

Tableau XX : Caractéristiques des différents tests comparés en PCR temps-réel

Tests	Publication dans un article ?	Gènes cibles et technologies utilisées	Séquences
Ledbetter et <i>al.</i> , 2009c Nommé « LED-Tk » par la suite	Oui	Thymidine kinase (Tk) du CHV PCR quantitative Taqman	<ul style="list-style-type: none"> • Amorces (respectivement sens et anti-sens) <ul style="list-style-type: none"> - CHVTK308F : 5' - CTG GCG TAT CAT CCT AGA AAC AGA T - 3' - CHVTK374R : 5'- ACG CAG CTT CCG GTC TTG TA - 3' • Sonde : <ul style="list-style-type: none"> - CHVTK334P FAM: 5' -TTG TGC AAG GTA TAT ACT C-MGB - 3'
Decaro et <i>al.</i> , 2010 Nommé "DEC-gB" pour la suite	Oui	Glycoprotéine B (gB) du CHV PCR quantitative Taqman	<ul style="list-style-type: none"> • Amorces (respectivement sens et anti-sens) <ul style="list-style-type: none"> - 5' - ACA GAG TTG ATT GAT AGA AGA GGT ATG - 3' - 5' - CTG GTG TAT TAA ACT TTG AAG GCT TTA - 3' • Sonde : <ul style="list-style-type: none"> - 6 - FAM- TCT CTG GGG TCT TCA TCC TTA TCA AAT GCG - BHQ1 • Taille de l'amplicon : 136 paires de bases

Maurière 2019 Nommé « MM-CHV » pour la suite	Non	Glycoprotéine B (gB) du CHV PCR quantitative Taqman	<ul style="list-style-type: none"> • Séquences non publiées dans un article scientifique • Taille de l'amplicon : 176 paires de bases
Test maison n°1 Nommé « LM-Tk » pour la suite	(Projet)	Thymidine kinase (Tk) du CHV PCR temps-réel EvaGreen®	<ul style="list-style-type: none"> • Séquences non communiquées (attente de publication) • Taille de l'amplicon : 162 paires de bases
Test maison n°2 Nommé « LM-gB » pour la suite	(Projet)	Glycoprotéine B (gB) du CHV PCR temps-réel EvaGreen®	<ul style="list-style-type: none"> • Séquences non communiquées (attente de publication) • Taille de l'amplicon : 94 paires de bases

Pour comparer la sensibilité de ces tests, de façon à la fois efficace et économique, dans une approche « semi-quantitative », nous avons tout simplement utilisé des dilutions sériées d'ADN de cellules canines MDCK infectées par la souche DK13 du CHV (ADN génomique de chien et d'herpèsvirus, paragraphe 3.2.1.). Des cellules MDCK non infectées ont été utilisées comme témoin négatif (ADN génomique uniquement de chien). Ces dilutions ont été analysées en PCR temps réel. Les différents paramètres suivants ont permis d'objectiver de possibles différences de sensibilité analytique entre les différents couples d'amorces. Tout d'abord, nous avons comparé le Ct de la première dilution avec le Cq de la dernière, sur une gamme de dilutions allant jusqu'à 8 log₁₀. Nous avons également déterminé la dilution limite de l'ADN infecté permettant encore de détecter un signal positif non ambigu, en regard de l'ADN de chien témoin négatif (ADN non infecté). Enfin, concernant les tests réalisés en Evagreen®, nous avons également vérifié la spécificité du signal obtenu par des « courbes de dissociations ». Ces dernières permettent de vérifier qu'il n'y a bien qu'un seul type d'amplicon produit et par conséquent une seule courbe de fusion, spécifique de cette entité. Cela signifie, dans ce cas, qu'il n'y a pas, par exemple, de bruit de fond lié à une possible dimérisation d'amorces, ou encore la production d'un 2^{ème} type d'amplicon non spécifique, ce qui pourrait fausser la sensibilité de nos tests.

Nous avons également vérifié, sur gel d'agarose, par électrophorèse, la présence des différents produits d'amplification et leur taille, pour les 5 tests, et leur « quantité relative » (intensité des

bandes). Chaque test a été réalisé au minimum au cours de 3 expériences indépendantes et jusqu'à 6 fois. Des dilutions de 3 différentes préparations ADN de cellules infectées ont été utilisées. A contrario, dans certaines répétitions d'expériences, nous avons limité le nombre de dilutions analysées en n'en utilisant qu'une sur deux par exemple.

3.1.4.1.2. La PCR en temps réel utilisant la technologie EvaGreen®

La technique de PCR en temps réel utilisée pour ce travail met en jeu un agent intercalant se liant à l'ADN double-brin, le colorant EvaGreen®. Pour cela, le kit *5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix (no ROX)* a été utilisé. La qPCR a été réalisée à l'aide de l'appareil « CFX-BIORAD ».

Pour rappel, nous avons choisi l'amorce maison « LM-gB » pour réaliser cette réaction.

3.1.4.1.2.1. Préparation en amont de la réaction

Pour réaliser une PCR en temps réel avec en EvaGreen®, des étapes préalables sont nécessaires. Tout d'abord, nous avons préparé un mix réactionnel, selon les recommandations du fabricant du kit *5 x HOT FIREPol® EvaGreen®* utilisé. Ce mix, est constitué du colorant EvaGreen®, des désoxyribonucléotides triphosphates, du chlorure de magnésium (agissant comme un cofacteur enzymatique), un tampon et une ADN polymérase. A ce mélange est ajouté une quantité fixée d'amorces sens et antisens (amorces « LM-gB ») et d'eau stérile, selon les recommandations du fabricant (Tableau XXI) (Figure 18). La quantité de mix préparée dépend du nombre de réactions voulues. Une fois le mix préparé, il est réparti de manière égale dans les puits d'une plaque 96 puits (Figure 19). A ces puits sont rajoutés les ADN à tester, selon les recommandations du fabricant du kit (Tableau XXI).

Tableau XXI : Recommandations pour la constitution du mix réactionnel pour qPCR EvaGreen®
selon les indications du fabricant

Composant	Volume	Concentration finale
5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix	4 µL	1 x
Amorce sens (10 pmol/µL)	0,5 – 1,0 µL	200 – 400 nM
Amorce anti-sens (10 pmol/µL)	0,5 – 1,0 µL	200 – 400 nM
ADN à tester	1 – 5 µL	1 – 50 ng/µL
Eau stérile grade PCR	Compléter jusqu'à un volume final de 20 µL	
Total	20 µL	

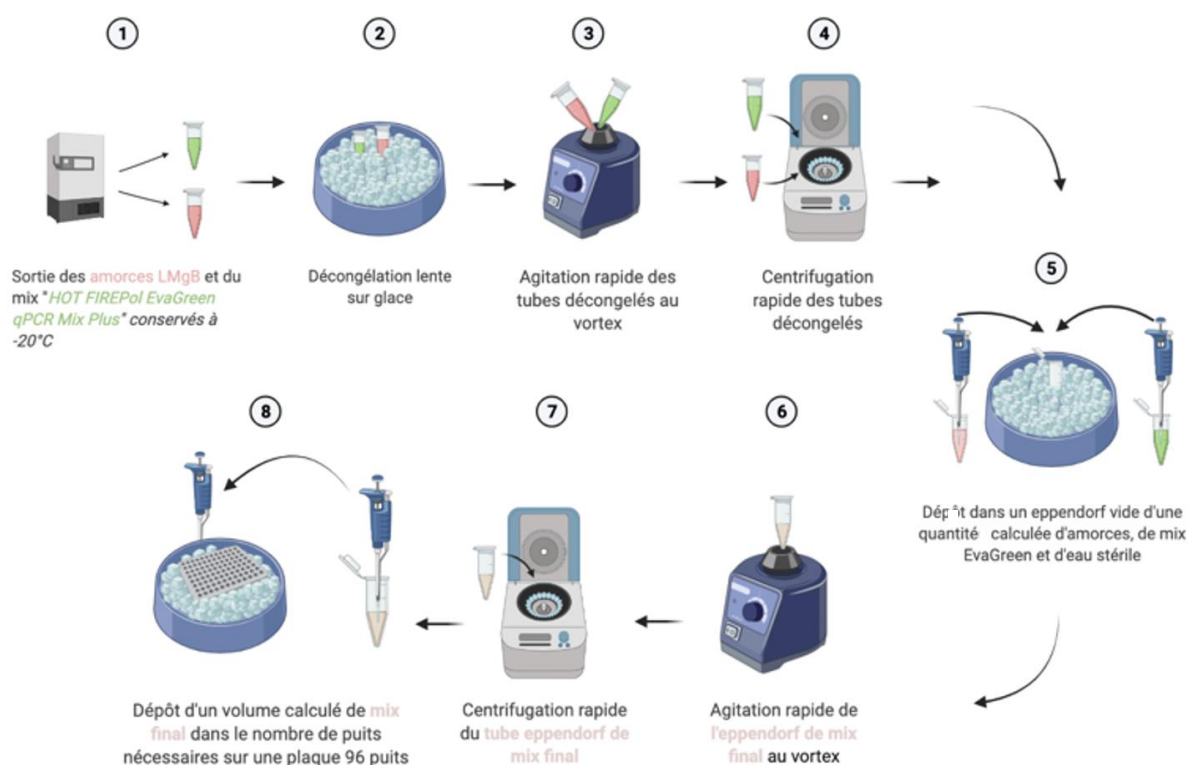


Figure 18 : Principales étapes de préparation du mix de PCR en temps réel EvaGreen® (créée sur Biorender.com)

Une fois ce mix réparti au sein des puits de la plaque sélectionnée, divers échantillons sont répartis dans ces puits (Figure 19). Tout d'abord, 3 contrôles sans matrice sont ajoutés, ce qui correspond à l'ajout de 5µL d'eau dans chacun des puits dédiés. Lors de la réaction, aucune fluorescence

significative ne doit être émise, puisqu'aucune matrice ADN n'est présente. Dans 3 autres puits sont déposés 5 µL d'ADN de chien exempt d'ADN correspondant au CHV, ce qui fournit un contrôle négatif. Hormis quelques éventuelles amplifications parasites pouvant produire un bruit de fond (sous le seuil), aucune fluorescence significative ne doit être émise lors de la réaction. Ensuite, des échantillons dits « standards », correspondant à des concentrations connues en ADN infecté par le CHV sont ajoutés. Dans le cadre de ce travail, 3 concentrations différentes ont été utilisées. Ainsi, 3 puits ont reçu 5 µL d'une solution concentrée à 150.10^{-5} ng/µL d'ADN contaminé par le CHV, 3 autres à 150.10^{-3} ng/µL et enfin 3 autres à 150.10^{-1} ng/µL. Enfin, pour chaque ADN à tester, 3 puits ont été remplis avec 5 µL de ce dit ADN (Figure 19). Le fait de travailler avec 3 puits pour chaque échantillon permet d'apprécier la reproductibilité intra-essai pour un même échantillon. Dans le cas où un trop faible volume d'ADN pour un échantillon était disponible, seulement 2 puits de cet échantillon étaient déposés.

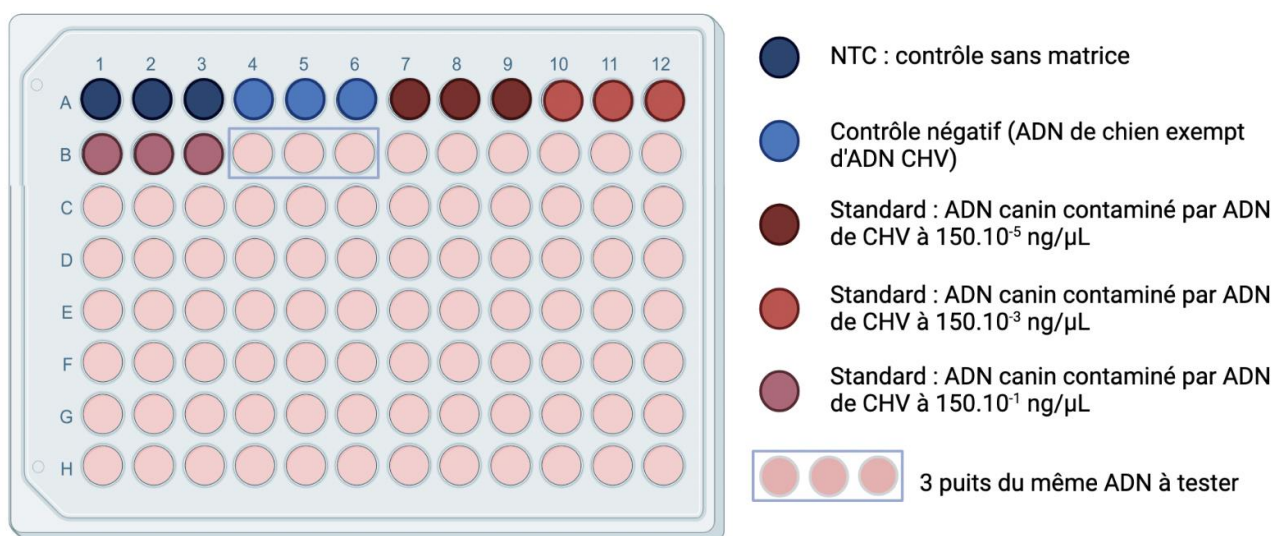


Figure 19: Schéma d'une plaque 96 puits classique utilisée pour les PCR temps-réel (créée sur Biorender.com)

3.1.4.1.2.2. Fonctionnement de la PCR temps réel Evagreen®

Lorsque le colorant EvaGreen® est libre dans la solution de départ, il n'émet que peu de fluorescence. Une fois la réaction amorcée, il se fixe au niveau de l'ADN double brin lorsque l'amplification de la séquence ciblée progresse. Cette liaison à l'ADN entraîne l'émission d'une fluorescence verte (Figure 20). Par conséquent, plus l'amplification progresse et plus la fluorescence cumulée mesurée augmente. Cette réaction PCR étant suivie en temps réel, la fluorescence cumulée

observée pendant la phase d'élongation augmente à chaque cycle. (Poitras et *al.*, 2002). L'appareil de PCR en temps-réel utilisé permet de suivre la quantité en temps réel d'ADN amplifié par la réaction en suivant cette fluorescence (Bustin 2000). Ici, la quantité de cible présente dans l'échantillon de départ est inversement proportionnelle au Cq obtenu.

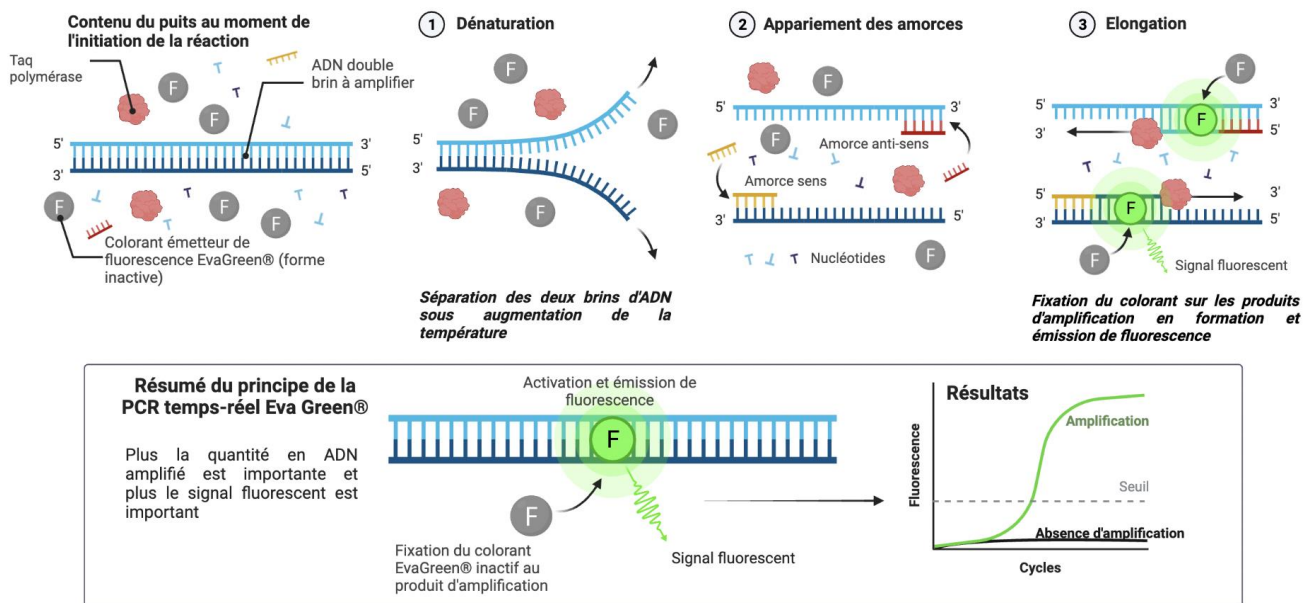


Figure 20 : Principales étapes et principe de fonctionnement de la PCR en temps réel EvaGreen® (créée sur Biorender.com)

L'interprétation du résultat obtenu se fait comme indiqué en partie 2.4.2.2.1.4. .

Cependant, la technologie EvaGreen® utilisant un intercalant et non pas une sonde, une étape supplémentaire est nécessaire pour interpréter nos résultats et s'assurer que l'amplification obtenue correspond bien à celle de la séquence recherchée. Le logiciel génère une courbe de dissociation permettant de mettre en relation la dérivée de la quantité de fluorescence émise (-dRFU/dT) en fonction de la température (°C). On peut alors en déduire une certaine température de fusion (T_m) du produit d'amplification spécifique des amorces utilisées. Cela permet de constater qu'un seul produit PCR a bien été amplifié, ce qui se traduit par la présence d'un unique pic sur la courbe obtenue. La présence d'un seul signal reflète la présence d'un seul type d'amplicon et prouve donc la spécificité de l'amorce au gène cible. Sur la Figure 21, représentant une courbe d'amplification générée suite à la réalisation d'une PCR temps-réel via la technique EvaGreen®, on

constate qu'il n'y a qu'un seul pic, aux alentours de $T_m = 77^\circ\text{C}$, ce qui traduit bien le fait qu'un seul produit est amplifié.

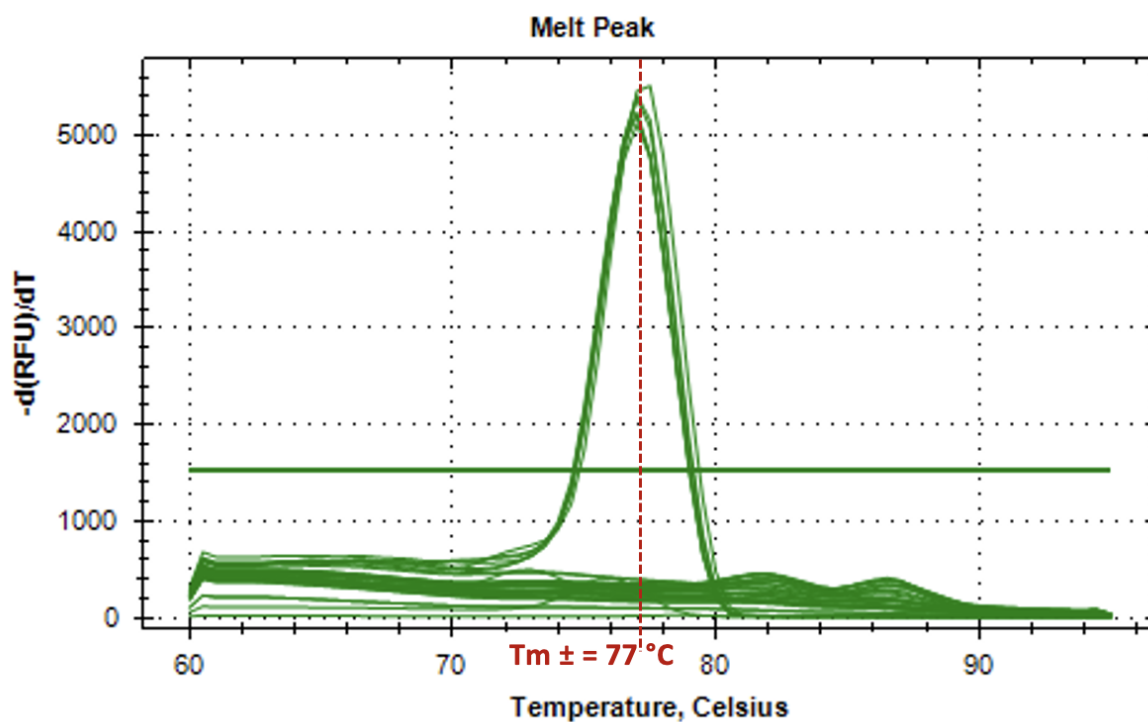


Figure 21: Exemple de courbe de dissociation obtenue via la technique EvaGreen®

3.1.4.1.3. Mode opératoire de la PCR en temps réel Taqman utilisée

Tout comme pour la réalisation d'une PCR temps-réel selon la méthode EvaGreen, des étapes préalables de préparation sont nécessaires pour effectuer une PCR temps-réel via la technique Taqman. L'utilisation d'une sonde implique de travailler avec un mix, différent d'une PCR en temps-réel en chimie EvaGreen. Nous avons utilisé le kit *Takyon No Rox Probe MasterMix TTP* commercialisé par Eurogentec (Tableau XXII). Lors de notre travail, le mix a été préparé selon les recommandations spécifiées. La quantité de mix préparée dépend du nombre de réactions voulues. Une fois le mix préparé (Figure 22), il est réparti de manière égale dans les puits d'une plaque 96 puits. A ces puits sont rajoutés les ADN à tester. Dans le cadre de ce travail, 5 μL d'ADN à tester ont été ajoutés dans les puits (Figure 19).

Tableau XXII : Recommandations pour la constitution du mix réactionnel pour qPCR Taqman selon les indications du fabricant

Composant	Volume	Concentration finale
Takyon™ MasterMix	10 µL	1 x
Amorce sens (10 pmol/µL)	2 µL	50 - 900 nM
Amorce anti-sens (10 pmol/µL)	2 µL	50 - 900 nM
Sonde	2 µL	100 - 250 nM
ADN à tester	1 - 4 µL	1 - 50 ng/µL
Eau stérile grade PCR	20 µL qsp	
Total	20 µL	

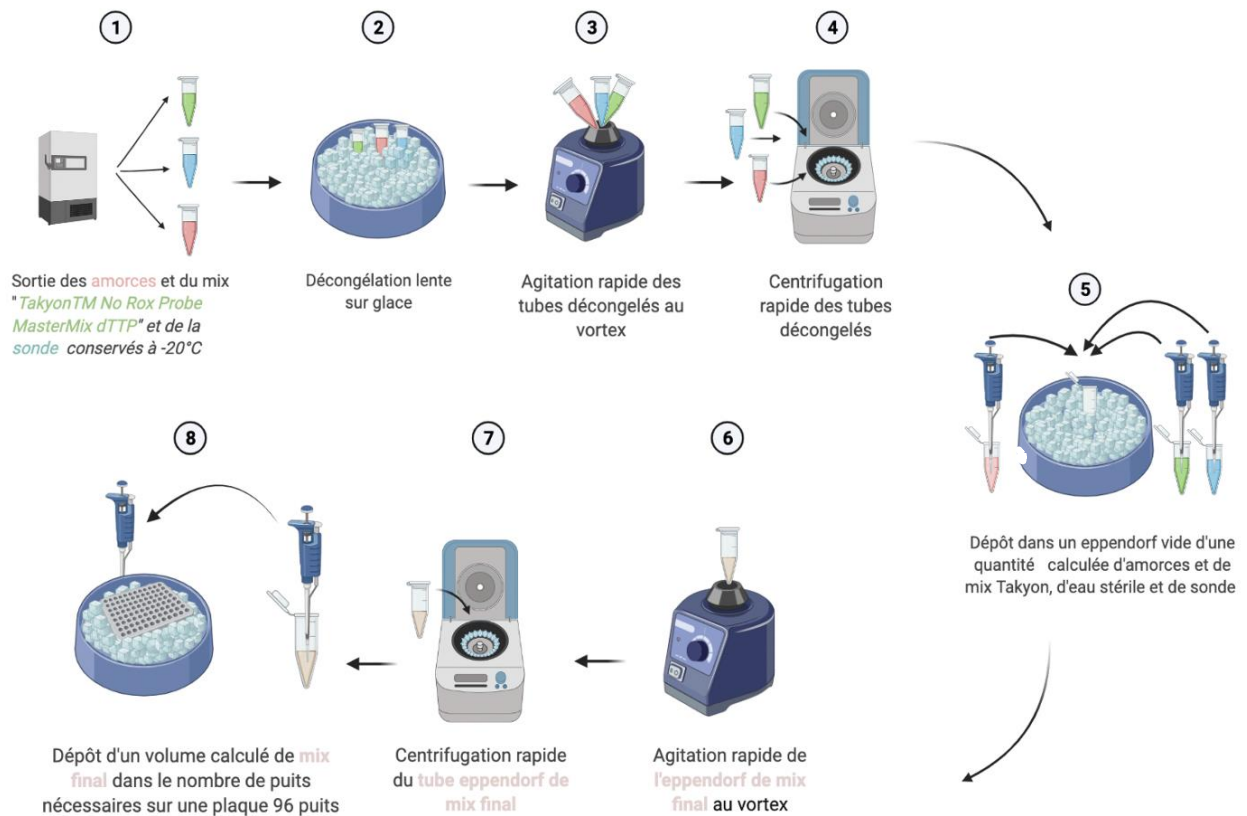


Figure 22 : Principales étapes de préparation du mix de PCR temps-réel Taqman (créée sur Biorender.com)

3.1.4.2. La qPCR Taqman, SCANELIS

Afin de confirmer ou d'infirmer certains de nos résultats, nous avons envoyé des échantillons dans un laboratoire de référence, SCANELIS, utilisant la méthode Taqman et ciblant le gène tk du CHV. Les échantillons ont été regroupés par 5 (en fonction de leur probabilité de positivité selon les éléments anamnestico-cliniques disponibles) et l'ADN mis en commun a été testé. Si ce dernier revenait positif, les ADN étaient testés séparément pour identifier le ou les positifs.

3.1.4.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

Le but de l'électrophorèse, appliquée à nos expériences, est de s'assurer qu'un échantillon revenant positif en PCR en temps réel, mais à la limite du bruit de fond, soit bien positif. Cela nous permettra donc de détecter des faux positifs éventuels. En pratique, un marqueur moléculaire est placé dans le premier puits (Figure 23), le contenu des puits des plaques de PCR temps-réel contenant l'ADN viral du CHV à diverses concentrations dans les suivants et les puits à tester dans les autres. Ici, nous avons utilisé un gel d'agarose à 2 % (*Invitrogen E-gel EX 2% Agarose-ThermoFisher*) afin de séparer les fragments de petite taille. La résolution de ce type de gel est de l'ordre de 5 paires de bases. Le marqueur moléculaire choisi ici est le *E-gel 50 pb DNA Ladder-ThermoFisher* d'une taille de 50 paires de bases et l'appareil utilisé est le *Invitrogen E-Gel Power Snap Camera-ThermoFisher*.

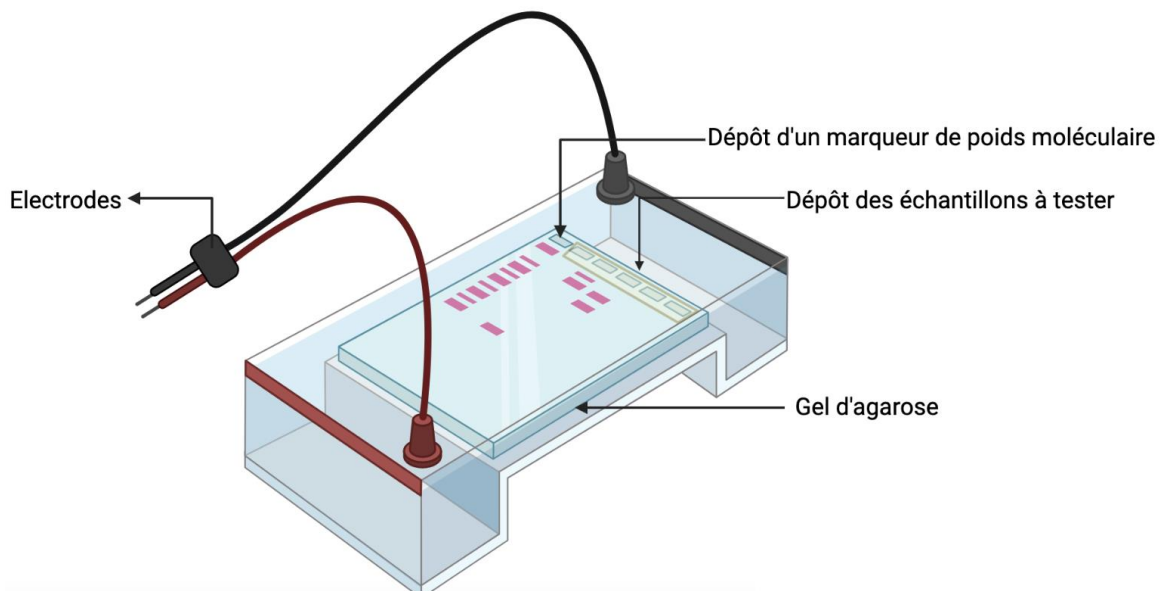


Figure 23 : Système d'électrophorèse sur gel (créée sur Biorender.com)

3.1.5. La sérologie

La technique sérologique utilisée pour détecter d'éventuels anticorps anti-CHV est l'immunofluorescence indirecte (IFI). Le laboratoire ayant effectué ces tests sérologiques n'est pas connu, mais travaille en partenariat avec le laboratoire SCANELIS, ayant effectué des qPCR Taqman sur les écouvillons vaginaux, préputiaux et sur le sperme que nous leurs avons envoyés au cours de ce travail. Nous savons qu'il s'agit d'un laboratoire expérimenté mais nous ne pouvons malheureusement pas préciser la sensibilité ni la spécificité du test sérologique réalisé mais nous savons que le seuil de positivité est fixé à un titre en anticorps inférieur à 1/20. Nous avons prélevé le sérum de tous les animaux participant à l'étude (soit 93) mais n'avons pu n'en envoyer que 44, en raison de l'hémolyse de certains échantillons.

3.2. Résultats

3.2.1. Informations générales et éléments anamnestico-cliniques concernant les animaux prélevés

Le tableau XXIII rassemble les sexes, races, âges et principaux éléments anamnestico-cliniques des chiennes et chiens prélevés pour ce travail sur le CHV. Nous avons pu prélever 75 chiennes et 18 mâles. Seule une chienne n'a pas pu voir son sang prélevé face à son agressivité.

Tableau XXIII : Description et caractéristiques des animaux inclus pour la détection du CHV

Animal	Sexe	Age	Race	Éléments anamnestico-cliniques importants
FEMELLES				
F-001 ^(a)	Femelle	1,5 ans	Yorkshire Terrier	- Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-002 ^(a)	Femelle	1,5 ans	Biewer Terrier	- Née d'une portée sans problème - Gestante de 30 jours au moment des prélèvements
F-003 ^(a)	Femelle	2,5 ans	Biewer Terrier	- Née d'une portée sans problème - 2 portées sans anomalie

F-004^(a)	Femelle	3,5 ans	Biewer Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - 1^{ère} portée : tous les chiots sont morts - 2^{ème} portée : 1 survivant
F-005^(a)	Femelle	6 mois	Spitz Nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-006^(a)	Femelle	1,5 ans	Spitz Nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-007^(a)	Femelle	2 ans	Spitz Nain	<ul style="list-style-type: none"> - Avortement à 30 jours sur première gestation
F-008^(a)	Femelle	1,5 ans	Spitz Nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Saillie une fois sans gestation
F-009^(a)	Femelle	6 mois	Yorkshire Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Jamais mise à la reproduction - Née d'une portée à problèmes (2 survivants)
F-010^(a)	Femelle	7 mois	Yorkshire Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Saillie une fois sans gestation
F-011^(a)	Femelle	8 mois	Yorkshire Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Jamais mise à la reproduction - Née d'une portée à problèmes (seule survivante à la naissance)
F-012^(a)	Femelle	5 mois	Spitz Nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-013^(a)	Femelle	5 mois	Biewer Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Jamais mise à la reproduction - Née d'une portée à problèmes (seule survivante à la naissance)
F-014^(a)	Femelle	4 mois	Yorkshire Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-015^(b)	Femelle	2 ans	Pomsky	<ul style="list-style-type: none"> - Vaccinée contre le CHV - 1^{ère} mise-bas 2 semaines avant les prélèvements sans problème - Née d'une portée sans problème
F-016^(b)	Femelle	1,5 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Gestante de 30 jours - Vaccinée CHV au 8^{ème} jour de gestation (vaccin acheté en avance et conservé)
F-017^(b)	Femelle	1,5 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Gestante de 20 jours
F-018^(b)	Femelle	3 ans	Labrador Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'information sur la naissance - 3 mise-bas avec de la mortinatalité à chaque fois

				<ul style="list-style-type: none"> - Dernière mise-bas 15 jours avant les prélèvements. Mise sous couveuse des chiots à la naissance
F-019^(b)	Femelle	2 ans	Pomsky	<ul style="list-style-type: none"> - 1^{ère} mise-bas 1 mois avant les prélèvements - Doublement vaccinée CHV lors de la gestation selon les recommandations du RCP** - Pas de soucis au niveau des chiots de sa portée
F-020^(b)	Femelle	1 an	Pomsky	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-021^(b)	Femelle	3 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une mère dont la précédente portée est morte - Mortinatalité sur chacune des portées - Vaccinée CHV
F-022^(b)	Femelle	3 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Mortinatalité sur 2 portées
F-023^(b)	Femelle	1,5 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une mère ayant eu plusieurs avortements et chiots mort-nés - Jamais mise à la reproduction
F-024^(b)	Femelle	1,5 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-025^(b)	Femelle	1,5 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-026^(b)	Femelle	2 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - A eu une portée sans problème
F-027^(b)	Femelle	7 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - N'est plus utilisée pour la reproduction - Issue d'une portée avec mortinatalité (sœur de F-028) - A eu des chiots mort-nés lors de ses 3 mises-bas
F-028^(b)	Femelle	7 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - N'est plus utilisée pour la reproduction - Issue d'une portée avec mortinatalité (sœur de F-027) - A eu des mort-nés sur 2 mises-bas. - Dernière mise-bas sans anomalie (chienne vaccinée CHV lors de celle-ci)
F-029^(c)	Femelle	4 ans	Dogue de Bordeaux	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction

				<ul style="list-style-type: none"> - Inséminée le lendemain des prélèvements - Sera vaccinée CHV lors de sa gestation
F-030^(c)	Femelle	7,5 ans	Dogue de Bordeaux	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 3 gestations sans anomalie - Vaccinée CHV selon les RCP** à chaque gestation
F-031^(d)	Femelle	2 ans	Spitz nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 2 chiots momifiés et 2 chiots sains lors de son unique mise-bas
F-032^(d)	Femelle	2 ans	Spitz nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 2 chiots sur 5 mort-nés lors de son unique mise-bas
F-033^(d)	Femelle	3 ans	Spitz nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Avortement sur première gestation 1 semaine avant les prélèvements
F-034^(d)	Femelle	4 ans	Spitz nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Première et unique mise-bas à 1 an, sans anomalie - Depuis chaleurs irrégulières et pas de gestation malgré plusieurs IA*
F-035^(d)	Femelle	5 ans	Spitz nain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 2 avortements - Aucune mise-bas
F-036^(e)	Femelle	1 an	Chihuahua	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-037^(e)	Femelle	1 an	Chihuahua	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-038^(e)	Femelle	4 ans	Chihuahua	<ul style="list-style-type: none"> - Avortements sur 4 IA* (seule information)
F-039^(f)	Femelle	4 mois	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction - Née d'une mère vaccinée CHV lors de la gestation
F-040^(f)	Femelle	3 ans	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 2 portées sans problème - Vaccinée CHV selon les recommandations du RCP** lors de ses 2 gestations
F-041^(f)	Femelle	3 ans	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 1 portée sans problème

				<ul style="list-style-type: none"> - Vaccinée CHV selon les recommandations du RCP** lors de sa gestation
F-042^(f)	Femelle	3 ans mois	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 2 gestations - A perdu deux chiots 2 jours après sa dernière mise-bas - Vaccinée CHV selon les recommandations du RCP**
F-043^(f)	Femelle	6 mois	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-044^(f)	Femelle	7 mois	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-045^(f)	Femelle	8 mois	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-046^(f)	Femelle	8 mois	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-047^(f)	Femelle	3 ans	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - A eu une portée sans problème - Vaccinée CHV selon les recommandations du RCP** à chaque gestation
F-048^(f)	Femelle	3 ans	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - A eu une portée sans problème - Vaccinée CHV selon les recommandations du RCP** à chaque gestation
F-049^(f)	Femelle	2 ans	Akita américain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction - Importée des Etats-Unis - Épisode de toux du chenil ayant touché une vingtaine d'animaux 6 mois avant les prélèvements
F-050^(g)	Femelle	2 ans	Akita américain	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Importée des Etats-Unis - Épisode de toux du chenil ayant touché une vingtaine d'animaux 6 mois avant les prélèvements - A fait une métrite après une première insémination artificielle - A perdu 2 chiots 3 jours après sa première mise-bas.

F-051	Femelle	6 ans	Basset artésien normand	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'information sur sa naissance - Césarienne sur chiots momifiés quelques années auparavant - Sous traitement immunosuppresseur avec prednisolone à 1,7 mg/kg PO BID suite à forte suspicion de MICI ou de lymphome intestinal - Vaginite avec congestion muqueuse, écoulements muqueux et petits follicules sur la muqueuse. - Prélèvements réalisés lors de la constatation de ces lésions
F-052^(h)	Femelle	3 ans	Rottweiler	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - A eu 2 portées - 1 anasarque et 4 chiots vivants lors de sa première mise-bas - Mortinatalité de tous les chiots lors de la seconde portée - Pyomètre 2 semaines après sa 3^{ème} IA* - Vit dans un chenil avec une femelle dont l'autopsie des chiots est revenue en faveur du CHV
F-053^(h)	Femelle	1 an	American Staffordshire Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction - En œstrus au moment des prélèvements
F-054^(h)	Femelle	1 an	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction - En œstrus au moment des prélèvements
F-055^(h)	Femelle	6 ans	Rottweiler	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - A reproduit 3 fois, sans problème - Vit dans un chenil avec une femelle dont l'autopsie des chiots est revenue en faveur du CHV
F-056^(h)	Femelle	2 ans	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème. - A eu une portée, sans problème - Sous traitement antibiotique (amoxicilline et acide clavulanique) suite à deux injections d'alizine dans le cadre d'un pyomètre, au moment des prélèvements

F-057^(h)	Femelle	2 ans	American Bully	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-058^(h)	Femelle	1 an	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - N'a encore jamais mis bas - Saillie 2 semaines avant les prélèvements
F-059^(h)	Femelle	3 ans	American Staffordshire Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - A eu 3 mises-bas avec 2 chiots sains à chaque fois
F-060^(h)	Femelle	1 an	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-061^(h)	Femelle	1,5 an	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Saillie pour la 1^{ère} fois 7 jours avant les prélèvements
F-062^(h)	Femelle	1,5 an	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-063^(h)	Femelle	1 an	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-064^(h)	Femelle	1 an	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Jamais mise à la reproduction
F-065^(h)	Femelle	2 ans	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 1^{ère} portée, sans problème, 1 mois avant les prélèvements
F-066^(h)	Femelle	2 ans	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 2 chiots nés par césarienne lors de sa première gestation, 2 semaines avant les prélèvements
F-067^(h)	Femelle	2 ans	Staffordshire Bull Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 5 chiots nés par césarienne lors de sa première gestation, 10 jours avant les prélèvements
F-068^(h)	Femelle	2 ans	Rottweiler	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Tous les chiots de sa première portée sont morts dans les 5 premiers jours, 3 semaines avant les prélèvements - Autopsie d'un chiot de cette portée en faveur du CHV. - La chienne présentait des signes de rhinite avec jetage séreux lors des 2 dernières semaines de gestation

F-069^(b)	Femelle	1 an	Pomsky	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 1^{ère} mise-bas sans problème le jour des prélèvements
F-070^(b)	Femelle	2 ans	Pomsky	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 2^{ème} mise-bas 2 jours avant les prélèvements. Unique chiot de la portée est mort-né.* - Vaccination CHV selon les recommandations du RCP**
F-071^(b)	Femelle	1,5 ans	Pomsky	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 1^{ère} gestation à J50 lors des prélèvements - Vaccinée CHV selon les recommandations du RCP**
F-072^(b)	Femelle	1,5 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - 1^{ère} gestation à J40 lors des prélèvements
F-073^(b)	Femelle	7 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Prélèvements la veille de la mise-bas. - A déjà eu 4 portées sans problème - Vaccinée avec FELIGEN® CRP*** à J10 et J30 post IA* à cause d'une rupture de l'EURICAN 205®
F-074^(b)	Femelle	7 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - N'a jamais eu de problème lors de ses mises-bas - IA* 50 jours avant les prélèvements
F-075^(b)	Femelle	1,5 ans	Labrador Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Née d'une portée sans problème - Gestante de 45 jours au moment des prélèvements
MALES				
M-001^(a)	Mâle	3 ans	Spitz nain	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - Père de l'avortement de F-007
M-002^(a)	Mâle	2,5 ans	Yorkshire Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - Père d'une portée sans problème
M-003^(a)	Mâle	1 an	Biewer Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - N'a pas encore été mis à la reproduction
M-004^(a)	Mâle	3 ans	Biewer Terrier	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - Azoospermie depuis toujours
M-005^(b)	Mâle	5 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème

				<ul style="list-style-type: none"> - Père de deux portées avec mortinatalité, sur deux chiennes différentes
M-006^(b)	Mâle	6 ans	Golden Retriever	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - Père d'une portée avec mortinatalité. Père de 3 autres portées sans problème
M-007^(c)	Mâle	9 mois	Dogue de Bordeaux	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - N'a pas encore été mis à la reproduction
M-008^(d)	Mâle	5 ans	Spitz nain	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - Père de portées sans problème
M-009^(d)	Mâle	7 ans	Spitz nain	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - A été mis à la reproduction sans résultat - Un spermogramme a mis en évidence une oligospermie avec présence de coques et de polynucléaires neutrophiles 1 mois avant les prélèvements
M-010⁽ⁱ⁾	Mâle	9 ans	Berger de Beauce	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - Père de portées sans problème - Traitement à l'énilconazole dans le cadre d'une aspergillose nasale au moment des prélèvements
M-011⁽ⁱ⁾	Mâle	9 ans	Berger de Beauce	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - Père de portées sans problème - Actuellement sous traitement corticoïdes à 0,6 mg/kg à visée anti-prurigineuse dans le cadre d'une suspicion d'atopie canine
M-012⁽ⁱ⁾	Mâle	7 ans	Léonberg	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée avec deux chiots malformés - Père de portées sans problème
M-013^(e)	Mâle	1 an	Chihuahua	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème - N'a pas encore été mis à la reproduction
M-014^(k)	Mâle	5 ans	Welsh Corgi Cardigan	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de problème à la naissance - Prélèvements réguliers de semence pour inséminations artificielles
M-015^(k)	Mâle	5 ans	Welsh Corgi Cardigan	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de problème à la naissance - Prélèvements réguliers de semence pour inséminations artificielles
M-016^(f)	Mâle	1 an	Bulldog anglais	<ul style="list-style-type: none"> - Né d'une portée sans problème et d'une mère vaccinée CHV selon les recommandations du RCP** lors de la gestation

				- N'a pas encore été mis à la reproduction
M-017^(f)	Mâle	1 an	Bulldog anglais	- Né d'une portée sans problème et d'une mère vaccinée CHV selon les recommandations du RCP** lors de la gestation - N'a pas encore été mis à la reproduction
M-018^(f)	Mâle	3 ans	Bulldog anglais	- Né d'une portée sans problème - Père de deux portées sans problème

* IA = Insémination Artificielle

** RCP = Résumé des caractéristiques du produit

*** FELIGEN® CRP : vaccin avec une AMM pour les chats, pour immunisation active contre la rhinotrachéite virale du chat (FHV), la calicivirose féline (FCV) et la panleucopénie infectieuse féline

NB :

- Lorsqu'aucune précision n'apparaît quant au statut vaccinal de l'animal, c'est qu'il n'est pas vacciné contre le CHV au moment des prélèvements
- (x) : les animaux provenant du même élevage sont identifiés avec la même lettre entre parenthèses

3.2.2. Extractions ADN des divers échantillons prélevés

L'extraction de l'ADN des échantillons à analyser est une étape indispensable à toute analyse PCR. Par conséquent, nous avons réalisé des extractions sur : du sang total, des écouvillons vaginaux et préputiaux, du sperme et les organes d'un chiot selon différents protocoles.

3.2.2.1. Sangs totaux

3.2.2.1.1. Femelles

Les sangs totaux de toutes les femelles ont pu être recueillis, à l'exception de celui de la femelle F-055 en raison de son agressivité lors des prélèvements (Tableau XXIV). Quelques rapports A260/A280 et A260/A230, grisés dans le tableau, sont en dehors des intervalles attendus (respectivement 1,80 – 2,00 et 2,00 – 2,20), mais en sont suffisamment proches pour que nous les conservions pour analyses PCR.

Tableau XXIV : Concentration d'ADN en ng/ μ L et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN extraits de sang total prélevé sur les femelles

Animal	Concentration en ADN (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
F-001	44,0	1,79	2,12
F-002	118,1	1,84	2,04
F-003	67,5	1,81	1,93
F-004	79,7	1,81	2,00
F-005	38,3	1,80	2,09
F-007	71,6	1,79	2,07
F-006	98,6	1,89	2,17
F-008	88,7	1,83	2,14
F-009	100,4	1,84	2,17
F-010	88,4	1,84	2,04
F-011	95,4	1,81	2,12
F-012	103,6	1,84	2,23
F-013	85,9	1,81	2,17
F-014	98,4	1,81	2,28
F-015	147,4	1,83	2,13
F-016	190,2	1,85	2,14
F-017	270,8	1,86	2,18
F-018	103,8	1,82	2,12
F-019	149,6	1,87	2,08
F-020	147,6	1,81	2,18
F-021	193,0	1,85	2,16
F-022	125,1	1,84	2,27
F-023	150,2	1,83	2,04
F-024	253,2	1,86	2,13
F-025	227,5	1,86	2,15
F-026	209,5	1,86	2,26
F-027	112,2	1,84	2,03
F-028	156,5	1,85	2,13
F-029	65,1	1,83	2,17
F-030	48,0	1,85	2,09
F-031	57,4	1,77	2,18
F-032	53,6	1,87	2,03
F-033	54,2	1,81	2,18
F-034	58,6	1,81	2,15
F-035	105,9	1,83	2,23
F-036	78,9	1,83	2,19

F-037	130,0	1,88	2,14
F-038	49,1	1,84	2,15
F-039	41,0	1,80	2,29
F-040	94,8	1,78	2,16
F-041	124,4	1,81	2,11
F-042	146,9	1,87	2,00
F-043	251,7	1,85	2,14
F-044	128,2	1,82	2,06
F-045	85,3	1,83	2,16
F-046	338,7	1,86	2,10
F-047	135,2	1,83	2,14
F-048	137,8	1,81	2,16
F-049	56,2	1,95	2,09
F-050	111,0	1,84	2,00
F-051	79,7	1,81	2,18
F-052	135,0	1,88	2,21
F-053	63,3	1,81	2,11
F-054	60,0	1,80	2,02
F-055	<i>Impossibilité de prélever du sang face au caractère de l'animal</i>		
F-056	88,6	1,81	2,12
F-057	64,1	1,99	2,06
F-058	79,8	1,84	2,11
F-059	47,0	1,81	2,23
F-060	68,2	1,80	1,98
F-061	56,8	1,82	2,06
F-062	55,6	1,91	2,02
F-063	58,9	1,95	2,05
F-064	174,5	1,80	2,07
F-065	49,1	1,82	2,02
F-066	68,9	1,87	2,13
F-067	53,4	1,80	2,16
F-068	75,7	1,83	2,02
F-069	274,9	1,99	2,14
F-070	213,2	1,97	2,12
F-071	172,6	1,90	2,04
F-072	109,9	1,87	2,29
F-073	188,0	1,90	2,19
F-074	117,1	1,82	2,25
F-075	208,7	1,88	2,15

3.2.2.1.2. Mâles

Les sangs totaux des 18 mâles intégrés à cette étude ont pu être prélevés. Les résultats des extractions ADN de ces prélèvements sont satisfaisants et ont tous été conservés pour la suite des manipulations (Tableau XXV). Tout comme pour les femelles, les rapports A260/280 et A260/A230 en dehors des intervalles attendus sont grisés dans le tableau qui suit.

Tableau XXV : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN extraits de sang total prélevé sur les mâles

Animal	Concentration en ADN (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
M-001	80,1	1,82	2,17
M-002	62,9	1,83	2,08
M-003	61,3	1,84	2,10
M-004	62,8	1,94	2,16
M-005	123,9	1,84	2,08
M-006	157,4	1,83	2,14
M-007	113,2	1,83	2,13
M-008	78,1	1,86	2,11
M-009	59,7	1,88	2,06
M-010	107,3	1,86	2,17
M-011	67,4	1,82	2,08
M-012	129,3	1,81	2,28
M-013	126,1	1,81	2,04
M-014	135,1	1,85	2,14
M-015	167,3	1,85	2,25
M-016	198,8	1,86	2,17
M-017	128,1	1,83	2,13
M-018	131,2	1,83	2,11

3.2.2.2. Écouvillons vaginaux

Les cellules vaginales présentes sur les cytobrosses utilisées pour réaliser les prélèvements vaginaux de toutes les femelles ont pu être extraits, y compris pour la femelle F-055 (Tableau XXVI). Quelques rapports A260/A280 et A260/A230 sont en dehors des intervalles attendus (respectivement 1,80 – 2,00 et 2,00 – 2,20), mais en sont suffisamment proches pour que nous les conservions pour la suite des manipulations. Les valeurs en dehors de ces intervalles sont grisées.

Tableau XXVI : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN extraits à partir des cellules prélevées par cytobrosses vaginales

Animal	Concentration en ADN (ng/μL)	260/280	260/230
F-001	36,3	1,80	2,06
F-002	59,9	1,81	2,01
F-003	37,2	1,83	2,18
F-004	81,8	1,82	2,07
F-005	57,6	1,83	2,08
F-007	43,0	1,81	2,17
F-006	35,8	1,81	2,01
F-008	34,6	1,84	2,13
F-009	43,7	1,85	2,12
F-010	37,7	1,82	2,07
F-011	38,1	1,80	2,12
F-012	53,3	1,87	2,18
F-013	65,2	1,97	2,13
F-014	87,3	1,93	2,17
F-015	36,1	1,80	2,08
F-016	79,3	1,81	2,12
F-017	56,0	1,83	2,13
F-018	47,0	1,80	2,06
F-019	84,0	1,81	2,14
F-020	108,3	1,82	2,09
F-021	57,2	1,80	2,05
F-022	54,6	1,78	2,12

F-023	44,7	1,81	2,02
F-024	54,8	1,79	2,15
F-025	52,4	1,82	2,18
F-026	56,5	1,80	2,05
F-027	56,6	1,81	2,16
F-028	48,3	1,82	2,11
F-029	45,0	1,82	2,19
F-030	53,4	1,79	2,00
F-031	47,7	1,81	2,08
F-032	53,5	1,85	2,19
F-033	54,0	1,83	2,06
F-034	45,1	1,92	2,16
F-035	56,6	1,80	2,07
F-036	60,2	1,80	2,08
F-037	50,8	1,80	2,16
F-038	52,1	1,81	2,20
F-039	32,8	1,82	2,17
F-040	33,8	1,86	2,13
F-041	35,8	1,79	2,15
F-042	44,8	1,76	2,22
F-043	65,4	1,80	2,04
F-044	59,9	1,81	2,21
F-045	44,1	1,80	2,04
F-046	37,7	1,85	2,03
F-047	33,6	1,83	2,19
F-048	55,7	1,80	2,08
F-049	63,9	1,83	2,19
F-050	41,3	1,82	2,18
F-051	53,2	1,85	2,23
F-052	131,9	1,81	2,06
F-053	56,2	1,80	1,79
F-054	55,2	1,76	2,08
F-055	50,8	1,84	2,01
F-056	149,7	1,87	2,11
F-057	238,6	1,87	2,19

F-058	205,0	1,85	2,19
F-059	58,9	2,00	2,08
F-060	174,0	1,86	2,18
F-061	53,4	1,84	2,00
F-062	52,7	1,85	2,05
F-063	61,0	1,85	2,14
F-064	80,9	1,91	2,18
F-065	52,9	1,81	2,05
F-066	222,5	1,89	2,15
F-067	196,6	1,88	2,18
F-068	665,9	1,85	2,25
F-069	38,7	1,81	2,07
F-070	52,0	1,90	2,01
F-071	47,6	1,86	2,06
F-072	52,4	1,97	2,09
F-073	44,0	1,83	2,03
F-074	60,4	1,79	2,16
F-075	51,2	1,84	2,19

3.2.2.3. Écouvillons préputiaux

Les ADN des cellules préputiales présentes sur les cyto-brosses utilisées pour réaliser les prélèvements au niveau du prépuce de tous les mâles ont pu être extraits (Tableau XXVII). Seuls deux rapports A260/A230 sont en dehors des intervalles attendus, mais en sont suffisamment proches pour que nous conservions le produit des extractions. Globalement, ces dernières sont bonne qualité et les concentrations sont largement suffisantes pour analyses PCR.

Tableau XXVII : Concentration d'ADN en ng/ μ L et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN des cellules prélevées par cytobrosses préputiales

Animal	Concentration en ADN (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230
M-001	31,7	1,85	2,07
M-002	32,2	1,88	2,13
M-003	51,3	1,84	2,00
M-004	48,9	1,83	2,17
M-005	50,3	1,84	2,11
M-006	77,7	1,81	2,13
M-007	58,1	1,82	2,11
M-008	64,9	1,81	2,06
M-009	32,2	1,84	2,11
M-010	59,4	1,83	2,22
M-011	37,9	1,90	2,05
M-012	33,2	1,80	2,18
M-013	65,2	1,81	2,07
M-014	72,8	1,98	1,99
M-015	30,8	1,84	2,00
M-016	53,5	1,85	2,24
M-017	42,0	1,88	2,14
M-018	38,4	1,84	2,20

3.2.2.4. Spermes

L'ADN des fractions spermatiques et des fractions cellulaires des spermes des 18 mâles inclus dans l'étude ont pu être extraits. Les quelques valeurs grisées sont en dehors de l'intervalle attendu (1,80 - 2,00 et 2,00 - 2,20 pour les rapports A260/A280 et A260/A230) mais sont jugées suffisamment proches pour que de nouvelles extractions ne soient pas effectuées (Tableau XXVIII). Le temps nécessaire pour réaliser ces extractions, la rareté des échantillons, le coût, la qualité et la quantité d'ADN extrait de ces échantillons sont les principaux facteurs influençant cette décision.

Tableau XXVIII : Concentration d'ADN en ng/ μ L et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN de cellules spermatiques et de liquides spermatiques

Animal	Fraction spermatique	Concentration en ADN (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230
M-001	Liquidienne	34,1	1,95	2,20
	Cellulaire	68,9	1,89	2,12
M-002	Liquidienne	51,7	1,83	2,06
	Cellulaire	31,1	1,79	2,13
M-003	Liquidienne	29,8	1,80	2,18
	Cellulaire	69,2	1,82	2,17
M-004	Liquidienne	73,1	1,89	2,00
	Cellulaire	135,7	1,81	2,18
M-005	Liquidienne	34,2	1,81	2,21
	Cellulaire	78,4	1,85	2,05
M-006	Liquidienne	56,3	1,88	2,13
	Cellulaire	98,2	1,85	2,03
M-007	Liquidienne	30,0	1,85	2,22
	Cellulaire	76,2	1,91	2,18
M-008	Liquidienne	54,1	1,80	2,01
	Cellulaire	208,7	1,95	2,12
M-009	Liquidienne	28,4	1,82	2,09
	Cellulaire	57,3	1,82	2,03
M-010	Liquidienne	65,0	1,86	2,18
	Cellulaire	102,7	1,84	2,00
M-011	Liquidienne	43,8	1,78	2,11
	Cellulaire	187,2	1,94	2,14
M-012	Liquidienne	46,3	1,89	2,12
	Cellulaire	102,5	1,80	2,07
M-013	Liquidienne	51,1	1,83	2,21
	Cellulaire	93,0	1,87	2,17

M-014	Liquidienne	34,8	1,79	2,20
	Cellulaire	99,6	1,92	2,15
M-015	Liquidienne	45,9	1,87	2,01
	Cellulaire	101,1	1,80	2,06
M-016	Liquidienne	34,4	1,80	2,00
	Cellulaire	74,9	1,77	2,19
M-017	Liquidienne	29,3	1,89	2,10
	Cellulaire	75,2	1,95	2,14
M-018	Liquidienne	40,0	1,81	2,19
	Cellulaire	97,4	1,89	2,08

3.2.2.5. Organes du chiot mort moins de 24h *post-partum*

L'ADN de divers organes du chiot femelle, de la femelle F-070, mort dans les 24h *post-partum* a été extrait. Les résultats de ces extractions figurent au Tableau XXIX et sont satisfaisants.

Tableau XXIX : Concentration d'ADN en ng/μL et rapports des densités optiques A260/A280 et A260/A230 des ADN extraits de divers organes de l'unique chiot mort de la chienne F-070

Organe	Concentration en ADN (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
Nœud lombo-sacré	298,6	1,91	2,09
Nœud lymphatique mésentérique	205,5	1,90	2,18
Rein droit	441,2	1,93	2,06
Rein gauche	235,1	1,93	2,03
Foie	176,1	1,92	2,13
Foie	134,1	1,89	2,04
Rate	199,5	1,91	2,14
Rate	384,7	1,93	2,13
Poumon	222,1	1,86	2,15

Poumon	92,7	1,81	2,16
--------	------	------	------

3.2.3. PCR temps-réel

3.2.3.1. Résultats de la comparaison des différents tests PCR temps-réel et tests retenus

Pour les résultats qui suivent, une « dilution à 10^{-x} » veut dire que nous avons utilisé une solution d'ADN de chien extrait de cellules MDCK contaminées par la souche DK13 du CHV, dont la concentration finale est de $150 \cdot 10^{-x}$ ng/ μ L. La prise d'échantillon à chaque PCR étant de 5 μ L, nos tests vont de 75 ng pour la dilution 10^{-1} à $75 \cdot 10^{-8}$ ng d'ADN « infecté », pour la 10^{-8} .

3.2.3.1.1. Résultats des 5 tests comparés en PCR temps-réel

Comparaison des tests en chimie Taqman

Les figures suivantes illustrent les courbes d'amplifications obtenues en PCR temps-réel à l'aide des différents tests que nous souhaitons comparer en technologie Taqman (Figures 24 et 25).

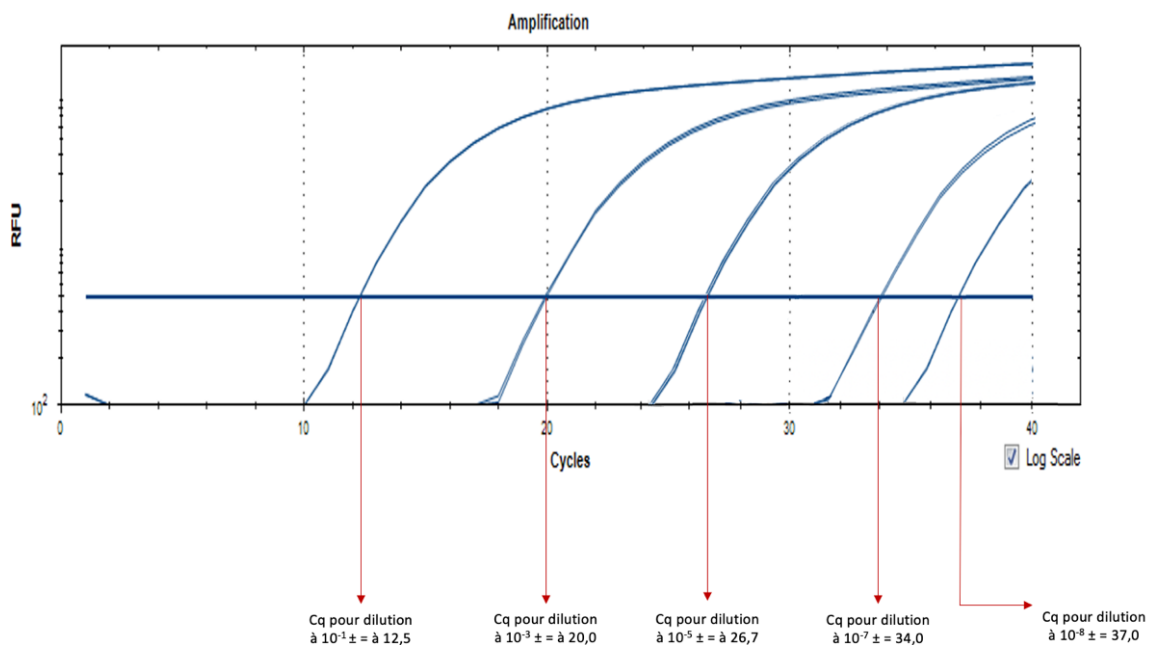


Figure 24 : Exemple de courbe d'amplification de l'amorce « LED-TK » (Taqman)

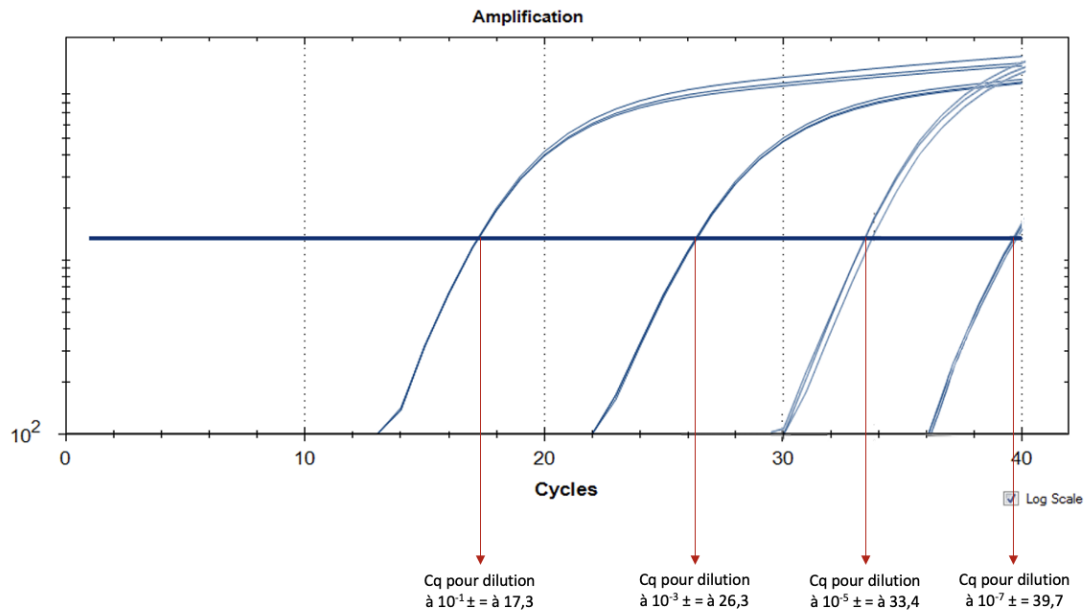


Figure 25 : Exemple de courbe d'amplification de l'amorce « DEC-gB » (Taqman)

La PCR Taqman temps-réel de Ledbetter dans le gène TK (« LED-Tk »), s'avère clairement, au travers de nos différents critères semi-quantitatifs (Cq à 10^{-1} et à 10^{-7} ou 10^{-8} ; limite de détection effective; résultats des témoins négatifs), comme la plus sensible, avec une limite de détection pour une dilution autour de 10^{-8} . Nous voyons que le Cq de la dilution 10^{-1} est aussi particulièrement précoce (13 cycles environ), pour le premier test (Figure 24). A l'inverse le Cq de la dilution 10^{-1} du test « DEC-gB » est moins précoce (17 cycles environ, Figure 25). Ce décalage vers la droite d'environ 4 cycles pour le test « DEC-gB », montre clairement qu'il est moins sensible que le « LED-Tk ». Ce test « DEC-gB » est néanmoins probablement assez efficace et se classe en second d'après nos critères.

Nous avons confirmé, lors de nos manipulations, le moins bon positionnement des amorces du test « MM-CHV » observé par Mélissa Maurière dans le travail antérieur déjà évoqué de 2019 (d'où données non montrées ici).

Ces 3 tests Taqman utilisent donc une sonde fluorescente, ce qui favorise certes la spécificité, mais augmente rapidement et considérablement le coût des analyses de criblage d'échantillons, dès qu'on s'intéresse à une ou plusieurs centaines de prélèvements biologiques. Ceci nous a conduit à développer de nouveaux tests PCR en EvaGreen®, qui nous sont propres, et à les comparer avec les deux tests très sensibles précédents, déjà publiés (« LED-Tk » et « DEC-gB »).

Comparaison des tests en chimie EvaGreen®

Pour ce qui est de la comparaison des tests « LM-gB » et « LM-Tk » en EvaGreen®, nous obtenons les courbes suivantes d'amplifications types (Figure 26 et 27).

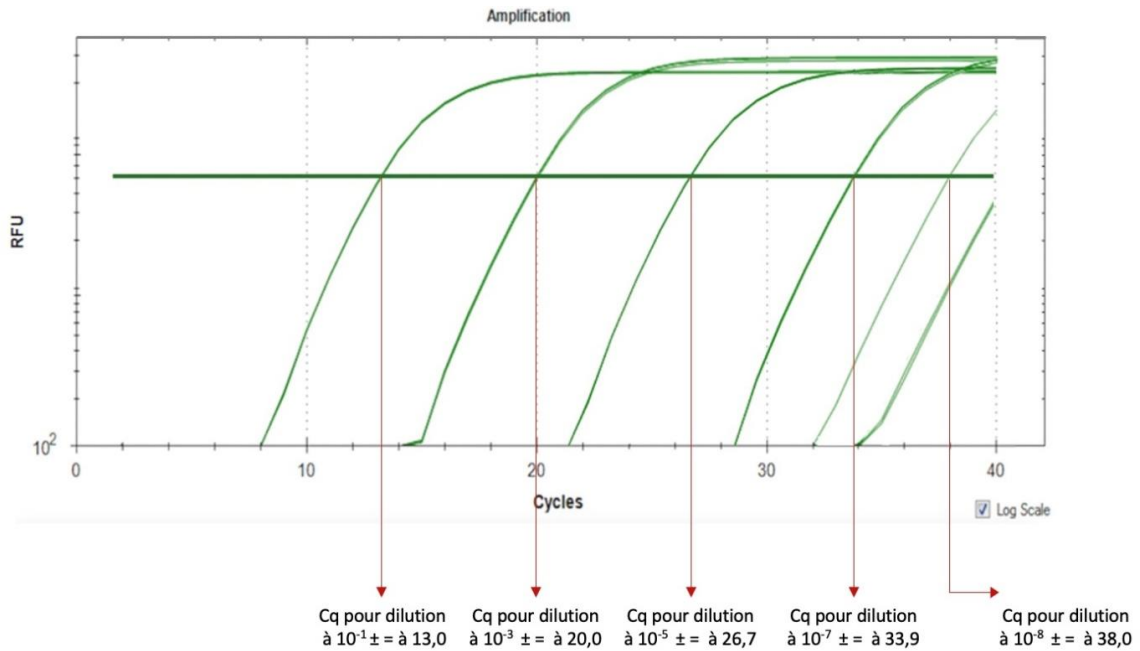


Figure 26 : Courbe d'amplification de l'amorce LM-gB (EvaGreen®)

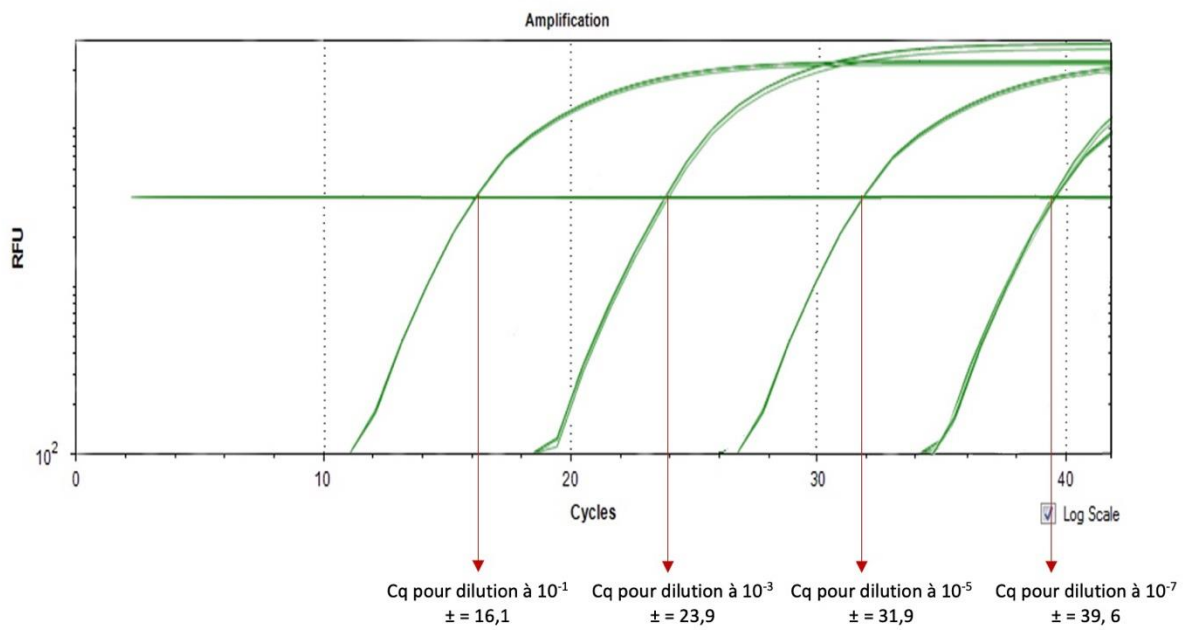


Figure 27 : Courbe d'amplification de l'amorce LM-Tk (EvaGreen®)

Toujours sur la base de nos mêmes critères, nous constatons que la sensibilité du test « LM-gB » est meilleure que celle du test « LM-Tk ». En effet, nous obtenons, par exemple, une amplification de l'ADN du CHV pour une dilution de 10^{-7} avec un Cq à environ 34 cycles, pour le test « LM-gB », alors que le Cq pour cette même dilution avec le test « LM-Tk » est d'environ 40. Notons qu'il est parfois possible d'obtenir une amplification pour une dilution à 10^{-8} avec le test « LM-gB » (notre figure 26 montre 1 courbe sur 3 « sortant » positivement au-dessus du seuil). Ce résultat à une dilution de 10^{-8} reste, il est vrai, inconstant, tandis que la positivité à une dilution à 10^{-7} est parfaitement reproductible.

Pour les tests utilisant la technologie EvaGreen®, nous devons analyser en plus des courbes d'amplification, leurs « courbes de dissociation ». En effet, cette chimie n'utilisant pas de sonde spécifique à la différence du Taqman, l'étape de dissociation est déterminante pour vérifier si l'amplification produit bien une unique séquence spécifique, ou si au contraire le test peut générer un bruit de fond. Les résultats typiques obtenus pour nos deux couples d'amorces sont présentés ci-après (Figures 28 et 29).

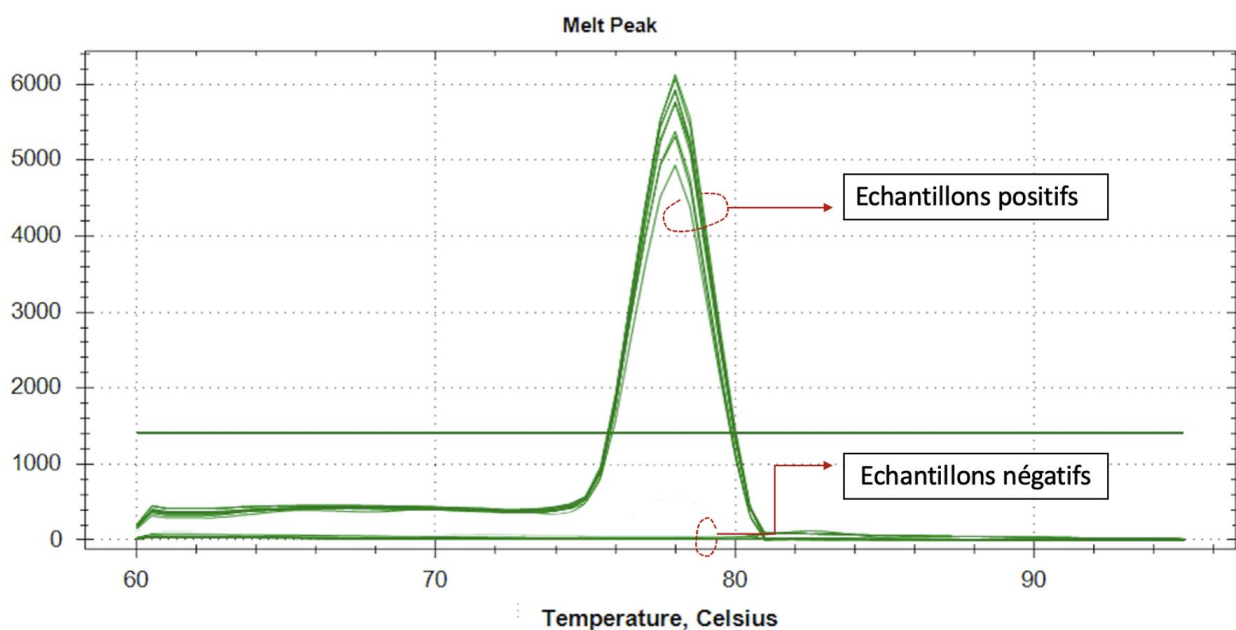


Figure 28 : Courbe de dissociation obtenue en EvaGreen® pour le test « LM-gB »

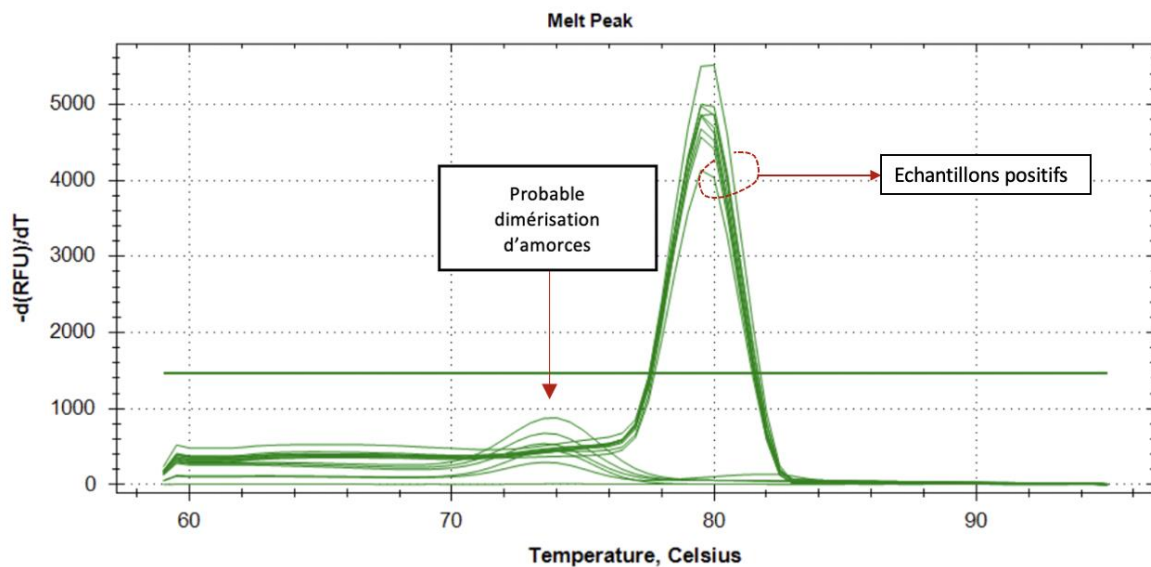


Figure 29 : Courbe de dissociation obtenue en EvaGreen® pour le test « LM-Tk »

La courbe de dissociation des amplicons associés au test « LM-gB » (Figure 28), montre une unique température de dissociation (T_m). Ceci n'est pas tout à fait le cas pour le test « LM-Tk », pour lequel deux températures sont identifiées (même si le « pic » de gauche sur la figure reste largement en dessous du seuil). Il est probable que ce pic, de T_m plus faible que celui du produit de taille attendu (il avoisine les 74°C contre environ 80°C pour l'amplicon spécifique) corresponde à la dimérisation d'amorces lorsqu'aucune cible CHV n'est présente (ADN de MDCK non infectées, donc témoins négatifs, Figure 29).

Pour résumer, notre test Evagreen® « LM-gB » donne des résultats très proches du test Ledbetter « LED-Tk ». La différence de limite de sensibilité analytique est, au maximum, de moins d'un logarithme décimal (la difficulté de notre test « LM-gB » à révéler systématiquement la dilution limite 10^{-8} , le classe juste après celui de Ledbetter). Ce test Evagreen® est en tout cas très clairement plus sensible que le test Taqman « DEC-gB » déjà publié.

3.2.3.1.2. Tests retenus pour l'analyse des échantillons en PCR temps-réel

Nous avons donc décidé d'utiliser, pour l'analyse des échantillons canins de terrain, d'une part le test « LED-Tk » en Taqman, plus coûteux, mais d'excellente sensibilité, et d'autre part notre test « LM-gB » en EvaGreen®, très sensible également et moins coûteux. L'idée est évidemment de comparer les résultats de ces deux tests et de voir particulièrement si nous risquons avec notre test moins coûteux de ne pas identifier des échantillons éventuellement infectés, qui seraient par contre positifs avec le test Taqman de référence.

Nous avons voulu valider cette approche comparative, également avec les résultats d'un prestataire indépendant, le laboratoire SCANELIS de Toulouse, qui utilise aussi un test Taqman dans le gène Tk. Nous n'avons, à ce sujet, pas pu obtenir de la part de cette société, la confirmation que leur couple d'amorces pourrait être le même que celui de Ledbetter, pour des raisons évidentes de confidentialité. Sans pouvoir en être sûr, nous avons de bonnes raisons de croire que cela pourrait être le cas. Quoiqu'il en soit, cela importe peu, en ce sens que SCANELIS est un laboratoire de référence, réputé en PCR quantitative, pour la détection de pathogènes en particulier viraux. Il est donc tout à fait pertinent de comparer nos résultats d'une part avec les deux tests retenus et d'autre part avec ceux de SCANELIS, au moins sur certains de nos échantillons. Les échantillons que nous leur avons envoyés sont des échantillons suspectés d'infection par le CHV, révélés positifs avec notre test PCR « LM-gB » EvaGreen et avec le test Taqman LED-TK. Nous avons fait également tester des échantillons négatifs provenant d'animaux que nous évaluons, d'un point de vue anamnestico-clinique, comme potentiels porteurs du virus, pour confirmer (ou pas), certains de nos résultats négatifs.

3.2.3.2. PCR en temps réel EvaGreen® réalisées à Oniris

Les résultats des PCR en temps-réel réalisées via la technique EvaGreen® à l'aide des amorces maison « LM-gB » conçues à Oniris et ciblant le gène de la glycoprotéine B (gB) du CHV, sur les ADN extraits des différents prélèvements effectués, sont reportés ci-dessous. Les résultats positifs sont surlignés.

3.2.3.2.1. Sangs totaux

3.2.3.2.1.1. Femelles

Nous avons testé le sang total de 74 femelles. L'ADN viral du CHV n'a été détecté que dans le sang total d'une unique chienne, la F-068 (Tableau XXX).

Tableau XXX : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les ADN des sangs totaux des chiennes et valeurs de Cq de l'échantillon positif

Animal	Résultat	Précisions éventuelles
F-001	Négatif	
F-002	Négatif	
F-003	Négatif	
F-004	Négatif	
F-005	Négatif	
F-007	Négatif	
F-006	Négatif	
F-008	Négatif	
F-009	Négatif	
F-010	Négatif	
F-011	Négatif	
F-012	Négatif	
F-013	Négatif	
F-014	Négatif	
F-015	Négatif	
F-016	Négatif	
F-017	Négatif	
F-018	Négatif	
F-019	Négatif	
F-020	Négatif	
F-021	Négatif	
F-022	Négatif	
F-023	Négatif	
F-024	Négatif	

F-025	Négatif	
F-026	Négatif	
F-027	Négatif	
F-028	Négatif	
F-029	Négatif	
F-030	Négatif	
F-031	Négatif	
F-032	Négatif	
F-033	Négatif	
F-034	Négatif	
F-035	Négatif	
F-036	Négatif	
F-037	Négatif	
F-038	Négatif	
F-039	Négatif	
F-040	Négatif	
F-041	Négatif	
F-042	Négatif	
F-043	Négatif	
F-044	Négatif	
F-045	Négatif	
F-046	Négatif	
F-047	Négatif	
F-048	Négatif	
F-049	Négatif	
F-050	Négatif	
F-051	Négatif	
F-052	Négatif	
F-053	Négatif	
F-054	Négatif	
F-055	<i>Impossibilité de prélever suffisamment de sang total face au caractère compliqué de l'animal</i>	
F-056	Négatif	
F-057	Négatif	
F-058	Négatif	

F-059	Négatif	
F-060	Négatif	
F-061	Négatif	
F-062	Négatif	
F-063	Négatif	
F-064	Négatif	
F-065	Négatif	
F-066	Négatif	
F-067	Négatif	
F-068	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 37,67 - Cq2 = 37,83
F-069	Négatif	
F-070	Négatif	
F-071	Négatif	
F-072	Négatif	
F-073	Négatif	
F-074	Négatif	
F-075	Négatif	

NB : Cq = cycle seuil

Notons que le Cq « tardif » (aux alentours de 38 cycles), suggère, si l'échantillon est bel et bien contaminé par de l'ADN du CHV, une quantité assez faible de virus . Face au fait que très peu d'études font mention de la découverte du virus dans des échantillons sanguins et au fait que la chienne F-068 soit la seule qui revienne positive parmi 75 chiennes, nous avons décidé de réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose 2% comme décrite au paragraphe 3.1.4.2..

Pour cela, nous avons déposé le marqueur de poids moléculaire à gauche (puits M). Dans les puits 1 à 6, nous avons déposé respectivement le contenu des deux puits de la plaque PCR temps-réel des échantillons standards testés avec des concentrations en ADN viral CHV à 10^{-1} ng/ μ L, 10^{-3} ng/ μ L et 10^{-5} ng/ μ L. Enfin, dans les puits 9 et 10, nous avons déposé les contenus des deux puits de la plaque de PCR temps-réel contenant l'ADN amplifié de l'échantillon de sang total de la femelle F-068. Les résultats de cette électrophorèse figurent ci-dessous (Figure 30).

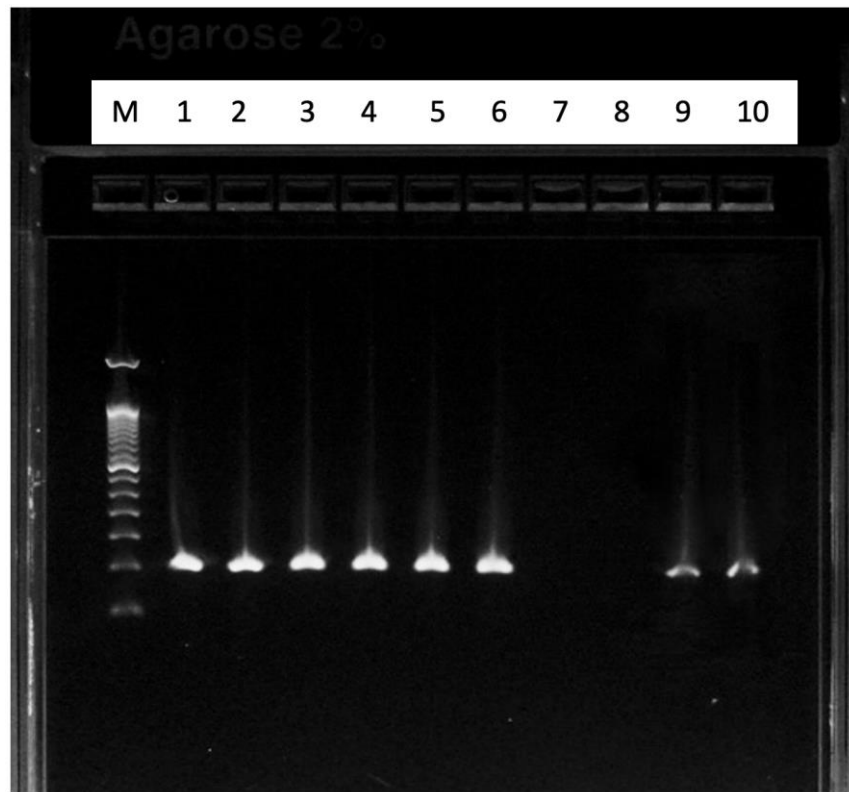


Figure 30 : Électrophorèse du produit de PCR temps-réel EvaGreen® de l'échantillon de sang total de la femelle F-068

Cette électrophorèse met en évidence que les bandes correspondant à l'ADN amplifié du sang total de F-068 sortent au même niveau que les bandes correspondant à de l'ADN viral de CHV à diverses concentrations initiales. Ceci confirme bien le résultat positif de la PCR temps-réel EvaGreen® obtenu pour l'ADN de sang total de la chienne F-068.

3.2.3.2.1.2. Mâles

En ce qui concerne les mâles, aucun des 18 mâles testés n'est positif au CHV sur sang total en utilisant la PCR temps-réel EvaGreen® avec les amorces « LM-gB » (Tableau XXXI).

Tableau XXXI : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les ADN de sang total des chiens mâles

Animal	Résultat
M-001	Négatif
M-002	Négatif
M-003	Négatif
M-004	Négatif
M-005	Négatif
M-006	Négatif
M-007	Négatif
M-008	Négatif
M-009	Négatif
M-010	Négatif
M-011	Négatif
M-012	Négatif
M-013	Négatif
M-014	Négatif
M-015	Négatif
M-016	Négatif
M-017	Négatif
M-018	Négatif

NB : Cq = cycle seuil

3.2.3.2.2. Écouvillons vaginaux

Les PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB », réalisées par nos soins à Oniris, ont permis de mettre en évidence l'ADN du CHV dans les prélèvements vaginaux de 3 chiennes différentes (sur 75 testées) : les chiennes F-023, F-051 et F-068 (Tableau XXXII) provenant de 3 élevages différents.

Tableau XXXII : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les ADN des écouvillons vaginaux effectués sur les chiennes et valeurs de Cq des échantillons positifs

Animal	Résultat	Précisions éventuelles
F-001	Négatif	
F-002	Négatif	
F-003	Négatif	
F-004	Négatif	
F-005	Négatif	
F-007	Négatif	
F-006	Négatif	
F-008	Négatif	
F-009	Négatif	
F-010	Négatif	
F-011	Négatif	
F-012	Négatif	
F-013	Négatif	
F-014	Négatif	
F-015	Négatif	
F-016	Négatif	
F-017	Négatif	
F-018	Négatif	
F-019	Négatif	
F-020	Négatif	
F-021	Négatif	
F-022	Négatif	
F-023	Positif	Échantillon testé trois fois - Cq1 = 27,72 - Cq2 = 27,76 - Cq3 = 27,70
F-024	Négatif	
F-025	Négatif	
F-026	Négatif	
F-027	Négatif	
F-028	Négatif	
F-029	Négatif	
F-030	Négatif	
F-031	Négatif	
F-032	Négatif	

F-033	Négatif	
F-034	Négatif	
F-035	Négatif	
F-036	Négatif	
F-037	Négatif	
F-038	Négatif	
F-039	Négatif	
F-040	Négatif	
F-041	Négatif	
F-042	Négatif	
F-043	Négatif	
F-044	Négatif	
F-045	Négatif	
F-046	Négatif	
F-047	Négatif	
F-048	Négatif	
F-049	Négatif	
F-050	Négatif	
F-051	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 12,41 - Cq2 = 12,41
F-052	Négatif	
F-053	Négatif	
F-054	Négatif	
F-055	Négatif	
F-056	Négatif	
F-057	Négatif	
F-058	Négatif	
F-059	Négatif	
F-060	Négatif	
F-061	Négatif	
F-062	Négatif	
F-063	Négatif	
F-064	Négatif	
F-065	Négatif	
F-066	Négatif	
F-067	Négatif	

F-068	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 13,30 - Cq2 = 13,27
F-069	Négatif	
F-070	Négatif	
F-071	Négatif	
F-072	Négatif	
F-073	Négatif	
F-074	Négatif	
F-075	Négatif	

NB : Cq = cycle seuil

La Figure 31 illustre le résultat positif pour l'échantillon F-023 sur la courbe d'amplification et la Figure 32 met en évidence que la température de dissociation de l'amplification correspondant à F-023 correspond bien à celle des échantillons standards positifs. Les Cq précoces (autour de 13) pour les chiennes F-068 et F-051 suggèrent une quantité d'ADN viral de CHV importante dans l'échantillon initial.

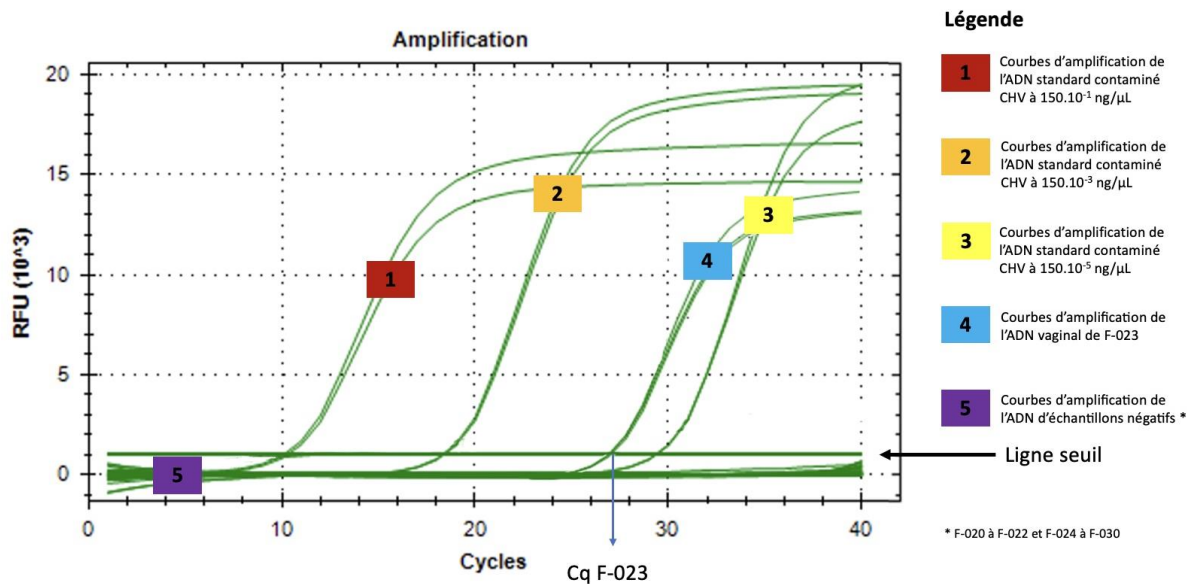


Figure 31 : Courbe d'amplification en PCR temps-réel EvaGreen® avec les amorces « LM-gB » mettant en évidence la positivité de l'échantillon d'ADN vaginal de la chienne F-023

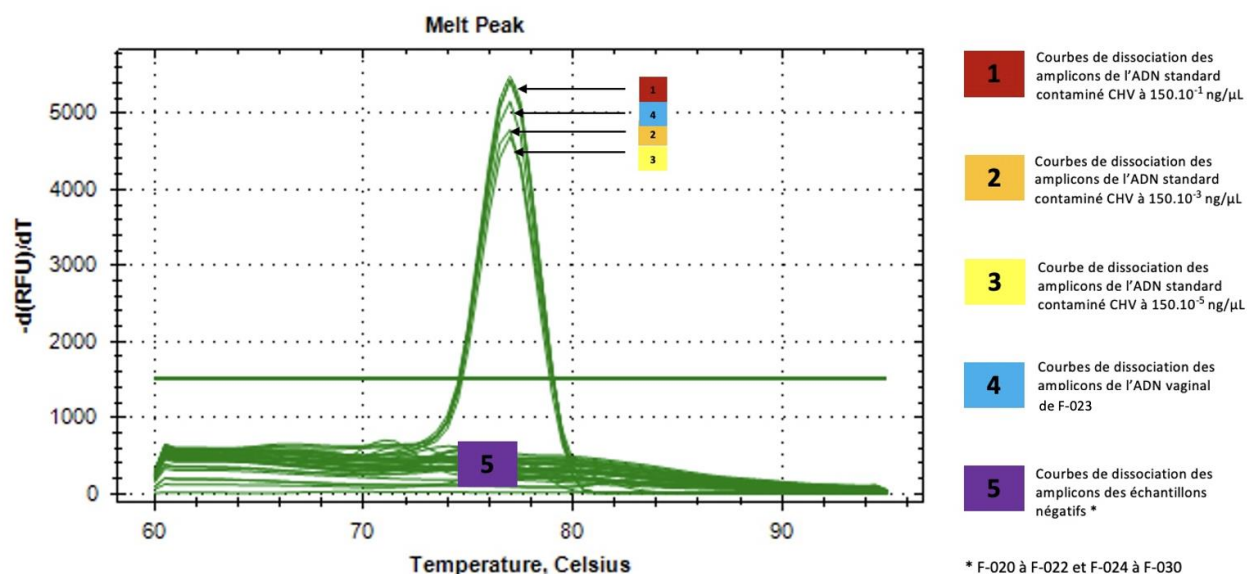


Figure 32 : Courbe de dissociation des PCR temps-réel EvaGreen® avec les amorces « LM-gB » mettant en évidence que la température de dissociation du produit d'amplification de l'ADN vaginal de F-023 correspond à celle des échantillons standards positifs au CHV

3.2.3.2.3. Écouvillons préputiaux

Aucune trace d'ADN viral du CHV n'a été détectée sur les ADN des écouvillons préputiaux des 18 mâles prélevés pour cette thèse (Tableau XXXIII).

Tableau XXXIII : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » sur les ADN des écouvillons préputiaux

Animal	Résultat
M-001	Négatif
M-002	Négatif
M-003	Négatif
M-004	Négatif
M-005	Négatif
M-006	Négatif
M-007	Négatif

M-008	Négatif
M-009	Négatif
M-010	Négatif
M-011	Négatif
M-012	Négatif
M-013	Négatif
M-014	Négatif
M-015	Négatif
M-016	Négatif
M-017	Négatif
M-018	Négatif

3.2.3.2.4. Spermes

Concernant les analyses PCR temps-réel EvaGreen® de spermes de chiens prélevés, les résultats sont séparés en deux : une partie est dédiée à l'analyse de la phase liquidiennne et l'autre est dédiée à l'analyse du culot cellulaire spermatique.

3.2.3.2.4.1. Phase liquide spermatique

Ici, trois individus sur 18 se révèlent positifs en PCR temps-réel EvaGreen® avec l'amorce maison « LM-gB » (Tableau XXXIV).

Tableau XXXIV : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les fractions liquidiennes spermatiques et valeurs de Cq des échantillons positifs

Animal	Résultat	Précisions éventuelles
M-001	Négatif	
M-002	Négatif	
M-003	Négatif	
M-004	Négatif	
M-005	Négatif	
M-006	Négatif	
M-007	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 18,13 - Cq2 = 18,17

M-008	Négatif	
M-009	Négatif	
M-010	Négatif	
M-011	Négatif	
M-012	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 13,74 - Cq2 = 13,56
M-013	Négatif	
M-014	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 16,23 - Cq2 = 16,10
M-015	Négatif	
M-016	Négatif	
M-017	Négatif	
M-018	Négatif	

NB : Cq = cycle seuil

3.2.3.2.4.2. Culot cellulaire spermatique

Les trois animaux pour lesquels l'ADN viral du CHV est détecté dans la phase liquidienne du sperme se révèlent également positifs lorsque l'analyse PCR en temps-réel du culot cellulaire du même sperme est effectuée (Tableau XXXV).

Tableau XXXV : Résultats des PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces « LM-gB » réalisées sur les fractions cellulaires spermatiques et valeurs de Cq des échantillons positifs

Animal	Résultat	Précisions éventuelles
M-001	Négatif	
M-002	Négatif	
M-003	Négatif	
M-004	Négatif	
M-005	Négatif	
M-006	Négatif	
M-007	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 20,16 - Cq2 = 19,57
M-008	Négatif	
M-009	Négatif	

M-010	Négatif	
M-011	Négatif	
M-012	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 14,89 - Cq2 = 15,01
M-013	Négatif	
M-014	Positif	Échantillon testé deux fois - Cq1 = 18,57 - Cq2 = 18,67
M-015	Négatif	
M-016	Négatif	
M-017	Négatif	
M-018	Négatif	

NB : Cq = cycle seuil

On constate que les Cq sont décalés de 1 à 2 cycles entre les phases liquidiennes et les phases cellulaires spermatiques, avec des Cq inférieurs pour les phases liquidiennes. On peut donc se demander si le virus n'est pas en majorité dans cette phase.

3.2.3.3. PCR temps réel Taqman réalisées à Oniris

Ne sachant pas exactement quelles amorces ciblant le gène Tk sont utilisées par le laboratoire SCANELIS (confidentialité évidente), nous avons décidé de contrôler une partie de nos résultats en utilisant la qPCR Taqman, technique plus spécifique que l'EvaGreen®. Nous avons utilisé les amorces « LED-TK » mises au point par Ledbetter et son équipe en 2009 (Ledbetter et *al.*, 2009c). Nous avons appliqué cette technique à un nombre limité d'échantillons pour une raison de coût. Pour cela, nous avons repris les échantillons vaginaux et sanguins revenus positifs et les avons testés. Les spermies n'étant pas extraits à temps pour cette manipulation, ils n'ont pas été testés avec cette technique et ces amorces. Nous avons également décidé de tester un nombre limité d'échantillons vaginaux et préputiaux d'animaux dont les éléments anamnestic-cliniques pouvaient faire penser à un passage du CHV chez ces individus.

3.2.3.3.1. Sang total

3.2.3.3.1.1. Femelles

Le virus étant très rarement détecté au niveau du sang total, nous avons décidé de ne tester que les sangs totaux des femelles que nous avons trouvées positives au niveau vaginal en PCR EvaGreen®. (soit 3 chiennes sur 75). Nos résultats sont confirmés, puisque seul le sang total de la femelle F-068 se révèle positif en Taqman « LED-TK » (Tableau XXXVI).

Tableau XXXVI : Résultats des PCR temps-réel Taqman utilisant les amorces « LED-Tk» réalisées sur les ADN de sang total des 3 chiennes positives au niveau vaginal en EvaGreen® « LM-gB » et valeur de Cq de l'échantillon positif

Animal	Résultat	Précisions éventuelles
F-023	Négatif	
F-051	Négatif	
F-068	Positif	Échantillon testé deux fois : - Cq1 : 33,53 - Cq2 : 32,89

3.2.3.3.1.2. Mâles

Pour la même raison que pour les femelles, nous n'avons testé que le sang total des mâles positifs au niveau spermatique en PCR temps-réel EvaGreen® (soit 3 mâles) le virus étant très rarement détecté dans le sang total. Sans surprise, aucun des trois sangs totaux testés n'est revenu positif (Tableau XXXVII).

Tableau XXXVII : Résultats des PCR temps-réel Taqman utilisant les amorces « LED-TK» réalisées sur les ADN extraits de sang total des 3 mâles aux spermatozoaires positifs

Animal	Résultat
M-007	Négatif
M-012	Négatif
M-014	Négatif

3.2.3.3.2. Écouvillons vaginaux

Suite à la réalisation de PCR en temps-réel en EvaGreen®, nous avons détecté la présence du CHV sur 3 écouvillons vaginaux : F-023, F-051 et F-068 (Tableau XXXVIII). Nous avons donc vérifié ces résultats en testant ces écouvillons en Taqman « LED-TK ». Nous avons également sélectionné des écouvillons correspondant à des femelles dont les éléments anamnestic-cliniques pouvaient être évocateurs d'une contamination par le CHV, ce qui revient à 25 femelles au total.

Tableau XXXVIII : Résultats des PCR temps-réel Taqman utilisant les amorces « LED-TK» réalisées sur les ADN des écouvillons vaginaux et valeurs de Cq des échantillons positifs

Animal	Résultat	Précisions éventuelles
F-004	Négatif	
F-007	Négatif	
F-009	Négatif	
F-010	Négatif	
F-011	Négatif	
F-013	Négatif	
F-018	Négatif	
F-021	Négatif	
F-022	Négatif	
F-023	Positif	Échantillon testé deux fois : - Cq1 : 26,22 - Cq2 : 26,84
F-027	Négatif	
F-028	Négatif	
F-031	Négatif	
F-032	Négatif	
F-033	Négatif	
F-034	Négatif	
F-035	Négatif	
F-038	Négatif	
F-049	Négatif	
F-050	Négatif	
F-051	Positif	Échantillon testé deux fois : - Cq1 : 12,17 - Cq2 : 12,05
F-052	Négatif	

F-055	Négatif	
F-068	Positif	Échantillon testé deux fois : - Cq1 : 12,71 - Cq2 : 12,75
F-070	Négatif	

Nous retrouvons ici des Cq très proches des Cq obtenus avec notre test EvaGreen « LM-gB », voire légèrement inférieurs. Le test « LED-TK » en Taqman semble donc légèrement plus sensible que notre test en EvaGreen®.

3.2.3.3.3. Écouvillons préputiaux

Nous n'avons testé que peu d'échantillons préputiaux car ils se sont tous révélés négatifs en PCR temps-réel EvaGreen®. Nous avons donc décidé de tester les écouvillons des 3 mâles dont le sperme est revenu positif avec cette technique : M-007, M-012, M-014. Les résultats négatifs obtenus ici en Taqman « LED-Tk » concordent parfaitement avec nos résultats obtenus en EvaGreen® « LM-gB » (Tableau XXXIX).

Tableau XXXIX : Résultats des PCR temps-réel Taqman utilisant les amorces « LED-TK » réalisées sur les ADN d'écouvillons préputiaux des 3 mâles aux spermes positifs

Animal	Résultat
M-007	Négatif
M-012	Négatif
M-014	Négatif

Pour des raisons de temps, nous n'avons pas pu tester les spermes des chiens prélevés via la technique PCR temps-réel Taqman avec les amorces « LED-Tk ».

3.2.3.4. Résultats des PCR quantitatives réalisées par le laboratoire SCANELIS

Les résultats des PCR quantitatives (qPCR) réalisées par le laboratoire SCANELIS, en technologie Taqman avec une sonde ciblant le gène de la thymidine kinase (TK) du CHV, figurent ci-après, pour

les différents échantillons envoyés. Cette technique nous permettant d’avoir des résultats quantitatifs, le nombre de copies du virus présentes initialement dans l’échantillon est indiqué lorsqu’il est obtenu. Pour rappel, ce laboratoire, comme de nombreux autres, ne réalise pas de qPCR sur sang total, la probabilité de retrouver du virus sur celui-ci étant très faible. Les résultats positifs sont surlignés.

3.2.3.4.1. Écouvillons vaginaux

Les qPCR Taqman avec une sonde ciblant une séquence du gène Tk, réalisées par le laboratoire d’analyses SCANELIS sur les 50 écouvillons vaginaux envoyés, ont permis de mettre en évidence l’ADN du CHV dans les prélèvements vaginaux de 3 chiennes différentes (Tableau XL). L’estimation quantitative n’a cependant pas pu être réalisée chez 2 des 3 chiennes positives, le seuil de quantification de la technique n’ayant pas été atteint. Chez la troisième chienne, F-051, la réaction de qPCR a permis l’amplification de la séquence cible du CHV, pour atteindre $3,24.10^7$ copies de cette séquence à la fin de la réaction. Ceci vient confirmer nos résultats apportés par la réalisation de PCR temps-réel à Oniris et nous permet d’avoir une quantification pour la chienne F-051.

Tableau XL : Résultats des PCR quantitatives Taqman réalisées par le laboratoire SCANELIS sur les ADN des écouvillons vaginaux réalisées sur les chiennes et nombre de copies virales détectées sur les échantillons positifs

Animal	Résultat	Précisions éventuelles
F-001	Négatif	
F-002	Négatif	
F-003	Négatif	
F-004	Négatif	
F-005	Négatif	
F-009	Négatif	
F-010	Négatif	
F-011	Négatif	
F-013	Négatif	
F-018	Négatif	
F-021	Négatif	
F-022	Négatif	

F-023	Positif	Estimation quantitative impossible car seuil de quantification non atteint
F-026	Négatif	
F-027	Négatif	
F-028	Négatif	
F-029	Négatif	
F-030	Négatif	
F-032	Négatif	
F-033	Négatif	
F-034	Négatif	
F-035	Négatif	
F-040	Négatif	
F-041	Négatif	
F-042	Négatif	
F-043	Négatif	
F-045	Négatif	
F-046	Négatif	
F-047	Négatif	
F-048	Négatif	
F-049	Négatif	
F-050	Négatif	
F-051	Positif	3,24.10⁷ copies de séquence cible par analyse
F-052	Négatif	
F-055	Négatif	
F-056	Négatif	
F-058	Négatif	
F-059	Négatif	
F-060	Négatif	
F-061	Négatif	
F-065	Négatif	
F-067	Négatif	
F-068	Positif	Estimation quantitative impossible car seuil de quantification non atteint
F-069	Négatif	
F-070	Négatif	
F-071	Négatif	
F-072	Négatif	

F-073	Négatif	
F-074	Négatif	
F-075	Négatif	

3.2.3.4.2. Écouvillons préputiaux

Les 10 écouvillons de cellules préputiales envoyés au laboratoire SCANELIS pour analyse qPCR Taqman sont tous revenus négatifs (Tableau XLI), confirmant parfaitement nos résultats obtenus avec en PCR EvaGreen® « LM-gB » réalisées par nos soins.

Tableau XLI : Résultats des PCR quantitatives Taqman réalisées par le laboratoire SCANELIS sur les ADN des écouvillons préputiaux réalisés sur les mâles

Animal	Résultat
M-001	Négatif
M-003	Négatif
M-004	Négatif
M-007	Négatif
M-008	Négatif
M-010	Négatif
M-012	Négatif
M-013	Négatif
M-014	Négatif
M-018	Négatif

3.2.3.4.3. Spermes totaux

L'analyse des spermes totaux des 18 mâles intégrés à l'étude a pu être réalisée par le laboratoire SCANELIS. Les qPCR Taqman effectuées ont permis la mise en évidence du virus chez 3 mâles. L'estimation quantitative n'a cependant pas pu être réalisée, le seuil de quantification de la technique n'ayant pas été atteint (Tableau XLII). Ceci confirme parfaitement les résultats obtenus en PCR EvaGreen® « LM-gB » et Taqman « LED-TK » réalisées par nos soins.

Tableau XLII : Résultats des PCR quantitatives Taqman réalisées par le laboratoire SCANELIS sur les ADN des spermatozoaires totaux prélevés sur 18 mâles et estimation quantitative du nombre de copies virales

Animal	Résultat	Précisions éventuelles
M-001	Négatif	
M-002	Négatif	
M-003	Négatif	
M-004	Négatif	
M-005	Négatif	
M-006	Négatif	
M-007	Positif	Estimation quantitative impossible car seuil de quantification non atteint
M-008	Négatif	
M-009	Négatif	
M-010	Négatif	
M-011	Négatif	
M-012	Positif	Estimation quantitative impossible car seuil de quantification non atteint
M-013	Négatif	
M-014	Positif	Estimation quantitative impossible car seuil de quantification non atteint
M-015	Négatif	
M-016	Négatif	
M-017	Négatif	
M-018	Négatif	

3.2.4. Sérologie

Les résultats des sérologies (réalisées par un laboratoire extérieur partenaire travaillant avec SCANELIS) sont reportés dans le Tableau XLIII. Pour rappel, le seuil de positivité est fixé à un titre de 1/20 par le laboratoire ayant effectué les tests. Les animaux pour lesquels les résultats sérologiques sont considérés comme étant positifs ont leurs titres sérologiques surlignés en gras. Trente-six des 44 animaux testés ont des titres sérologiques considérés positifs au CHV.

Tableau XLIII : Résultats des sérologies CHV réalisées par un prestataire extérieur

Identification des animaux	Titres sérologiques
F-001	1/80
F-003	1/80
F-004	1/20
F-007	1/40
F-009	1/80
F-010	1/40
F-011	1/40
F-013	1/80
F-014	1/80
F-018	1/80
F-019	1/80
F-021	1/80
F-022	1/80
F-023	1/80
F-024	1/80
F-026	< 1/20
F-027	1/80
F-046	< 1/20
F-049	1/160
F-050	1/320
F-052	1/80
F-053	1/20
F-054	1/640
F-055	1/320
F-056	1/20
F-057	< 1/20
F-059	1/20
F-060	1/20
F-061	1/40
F-062	< 1/20
F-063	< 1/20
F-064	1/20
F-065	< 1/20
F-066	1/40
F-067	1/320
F-068	1/160
F-069	1/80

F-070	1/80
F-073	1/80
F-075	1/40
M-001	1/80
M-003	< 1/20
M-004	1/40
M-018	< 1/20

3.2.5. Résultats d'autopsie

Il a été porté à notre connaissance, 3 semaines avant la réalisation de nos prélèvements dans l'élevage où se trouve la femelle F-068 (positive au niveau vaginal et du sang total), que l'autopsie d'un de ses chiots a été effectuée. Tous les chiots de la portée sont morts dans leur première semaine de vie. Le rapport complet de l'autopsie, réalisée par la Docteure Laëtitia DORSO, au sein d'Autopsie-Service à ONIRIS, est disponible en Annexe 8. Celui-ci conclut à la présence de lésions fortement évocatrices de l'herpèsvirose canine.

3.3. Discussion

Au cours de cette discussion, nous allons tout d'abord nous pencher sur la découverte majeure de ce travail, la détection, pour la première fois, du CHV dans le sperme de 3 chiens, et des conséquences que cela implique. Ensuite, nous nous pencherons sur l'interprétation des résultats chez les femelles positives tout en essayant d'en comprendre les mécanismes. S'en suivra une discussion sur l'interprétation, parfois difficile, des résultats sérologiques. Nous reviendrons sur les techniques PCR utilisées et les améliorations possibles. Enfin, nous essaierons de déduire des mesures applicables en élevage pour la gestion du CHV, à la lumière des résultats de ce travail.

3.3.1. Détection de l'ADN de l'herpèsvirus canin dans le sperme

3.3.1.1. Présence d'ADN viral de CHV dans le sperme

Nous avons, à l'aide de notre test PCR temps-réel EvaGreen® utilisant les amorces maison « LM-gB », mises au point pour ce travail, permis la mise en évidence factuelle de la présence du virus dans le sperme de chiens. Ces résultats sont d'autant plus importants qu'ils ont été confirmés à posteriori par un laboratoire de référence, le laboratoire SCANELIS. Notre étude nous a permis de détecter la présence d'ADN viral correspondant à celui de l'herpèsvirus canin dans le sperme de 3 chiens sur les 18 prélevés. Bien que la détection PCR du CHV dans la semence de chiens soit proposée dans des laboratoires de référence comme SCANELIS à Toulouse, France, nous n'avons trouvé aucune étude mettant formellement en évidence la présence du virus dans le sperme des chiens. Ceci est corroboré par un article datant de 2020, s'intéressant aux aspects éthiques et légaux des inséminations artificielles chez les chiennes, qui précise, qu' « à ce jour, aucune étude spécifique n'a été menée sur la transmission du CHV par le sperme » (Quartuccio et *al.*, 2020). Lors de nos tests, nous avons décidé de séparer les phases cellulaire et liquidienne de la semence des mâles, afin de pouvoir localiser la présence du virus dans une des phases, si nous découvriions un échantillon positif. Cependant, pour les 3 animaux positifs, les 2 phases sont positives à chaque fois. N'ayant effectué que des centrifugations pour séparer les cellules de la phase liquidienne, il est probable que le culot cellulaire contenant les spermatozoïdes ait été « contaminé » par le liquide spermatique ou encore par des cellules épithéliales pouvant provenir de l'urètre par exemple. De même, les spermatozoïdes ayant été congelés et manipulés, nous ne pouvons pas formellement exclure que des cellules aient été endommagées et que l'ADN de ces dernières se soit retrouvé libre dans la phase liquidienne, contaminant alors cette dernière. Donc, si nos résultats suggèrent la présence possible de virus dans le liquide urétral, on ne peut exclure une origine cellulaire, sans toutefois pouvoir la préciser (spermatozoïdes, cellules épithéliales, de Sertoli, de Leydig ... ?), à ce stade de l'étude.

3.3.1.2. Écouvillonnages préputiaux et positivité au CHV

Nous n'avons donc actuellement pas d'idée de la localisation précise du virus dans l'appareil reproducteur mâle. En effet, jusqu'à présent, aucune étude ne relatait la détection du virus dans le sperme. Il a été mis en évidence au niveau du prépuce à quelques reprises, notamment par Schulze et son équipe en 1998 sur un chiot mort à 1 semaine via une Hybridation In Situ (HIS) (Schulze et *al.*, 1998). Plus récemment, en 2022, le virus a été isolé via une PCR nichée au niveau du prépuce de 2 mâles au Brésil (Castro et *al.*, 2022).

De notre côté, nous n'avons jamais isolé de virus au niveau des écouvillons préputiaux (tests à Oniris et tests SCANELIS) et notamment chez les 3 chiens positifs au niveau de leur sperme tests à Oniris et tests SCANELIS). Plusieurs explications sont possibles. Il est possible que la quantité de virus ne soit pas suffisante pour être détectée par nos méthodes de biologie moléculaire. Il est également possible qu'un chien positif au niveau du sperme n'ai pas de virus au niveau du prépuce. Quoiqu'il en soit, on constate donc qu'on ne peut pas affirmer, sur la base d'un écouvillonnage préputial seul, qu'un chien ne peut pas transmettre le virus lors d'un accouplement, car sa semence peut, elle, être contaminée, ce qui est particulièrement important à prendre en compte lors de la reproduction pour ne pas propager le virus.

3.3.1.3. Focus sur les mâles positifs

Nous nous sommes intéressés de plus près aux 3 mâles dont le sperme est revenu positif au CHV. Notons tout d'abord que les 3 animaux ne proviennent pas du même élevage. Au moment des prélèvements, ils ne présentaient pas de signe clinique particulier.

3.3.1.3.1. Cas du mâle M-007

Le premier mâle, M-007, est un Dogue de Bordeaux de 9 mois n'ayant jamais sailli. Il n'est pas né d'une portée à problème. La maman, issue du même élevage, a été vaccinée lors de la gestation dont M-007 est issu, ce qui pourrait expliquer l'absence de problème imputable au CHV sur cette portée. Il n'était pas malade lors des prélèvements et ne recevait pas de traitement

immunosuppresseur. La question est la suivante : comment M-007 a-t-il pu être contaminé ? Plusieurs options s'offrent à nous. Tout d'abord, le chiot a pu être contaminé à la naissance par sa mère mais survivre grâce aux anticorps vaccinaux transmis à la naissance lors de la prise de colostrum. Il a également pu être contaminé après la naissance, par les autres animaux de l'élevage, notamment par voie oro-nasale. Enfin, tout contact avec des animaux excréteurs au cours de ses premiers 9 mois de vie n'est pas exclu. Nous n'avons pas, chez lui, retrouvé de virus au niveau du prépuce, ni au niveau du sang. Nous ne pouvons pas savoir si cela est dû à une absence formelle du CHV dans ces prélèvements ou à une présence trop faible du virus dans ceux-ci, qui le rendrait indétectable par les techniques d'analyses utilisées.

3.3.1.3.2. Cas du mâle M-012

Le second animal positif au niveau de son sperme, M-012, est un Léonberg mâle entier de 7 ans, né d'une portée comportant deux chiots malformés. Il est le père d'une portée sans problème de santé apparent. Les malformations des deux chiots issus de la même portée que lui pourraient être consécutives à une infection *in utero* par le CHV, sans que nous n'en ayons la certitude. Il a également pu être contaminé au cours de sa vie, par tout animal contaminé en contact avec lui. Le fait qu'il soit le père d'une portée sans anomalie notable pose question. Son sperme était-il négatif à ce moment-là ? A-t-il été contaminé après cette mise à la reproduction ? Était-il porteur latent à ce moment ? Sa semence est-elle positive au CHV en permanence ? Il serait intéressant de prélever régulièrement cet animal afin de retester son sperme à intervalle régulier et constater si ce dernier est toujours contaminé par l'herpèsvirus canin en permanence, ou non.

3.3.1.3.3. Cas du mâle M-014

Le troisième et dernier animal positif est le mâle M-014. C'est un mâle entier Welsh Corgi de 5 ans, issu d'une portée exempte de problème à la naissance et qui est régulièrement prélevé pour des inséminations artificielles. Un autre mâle, issu du même élevage et du même âge, M-015, a été prélevé et testé dans le cadre de cette étude. Aucune de ses analyses PCR ne sont revenues positives

(tests à Oniris et tests SCANELIS). Il n'a malheureusement pas été possible d'envoyer de prélèvement de sérum pour sérologie sur ces deux animaux, du fait de la mauvaise qualité des échantillons (hémolyse). Ceci aurait pu nous renseigner sur la présence éventuelle d'anticorps anti-CHV chez ses animaux, qui, rappelons-le, ne peuvent avoir d'anticorps vaccinaux détectables, le vaccin Eurican Herpes 205® étant en rupture depuis plusieurs mois avant les prélèvements. Ceci étant dit, le CHV pouvant entrer en latence, une sérologie et des PCR négatives ne peuvent être garantes d'un animal totalement exempt de ce virus.

Nous constatons ici que l'âge des 3 animaux positifs en PCR au niveau du sperme diffère, puisqu'il peut aller des quelques mois à plusieurs années. Nous ne pouvons malheureusement pas tirer de conclusion significative sur les âges des animaux atteints, notre échantillon d'animaux positifs étant très faible (3 mâles sur 18). De même, l'influence du logement ne peut être étudiée, les animaux testés vivant tous en collectivité. Il est à remarquer également que les mâles peuvent excréter le virus dans leurs spermes alors que rien ne laisse supposer une infection par le virus chez eux ou dans leur entourage.

3.3.1.4. Comment interpréter des résultats négatifs ?

Face aux divers résultats sur des échantillons différents (spermes, écouillons préputiaux), peut-on, à un moment donné, affirmer qu'un mâle n'est pas porteur du CHV ? La question se pose notamment pour un mâle avec un écouillon préputial négatif et un échantillon de sperme négatif, à un instant T. Dans ce cas, on peut juger que le risque de contamination d'une femelle par le virus est faible. Cependant, ceci est bel est bien valable à un instant T, celui des prélèvements. Rien n'indique que le mâle en question n'est pas porteur latent du virus, qui peut être réactivé à la faveur d'un stress. De plus, nous ne testons dans nos expériences, que des prélèvements intéressant la sphère génitale. Rien ne nous indique dans le cadre de ce travail, qu'un animal avec des PCR préputiales et spermatiques négatives n'excrète pas de virus au niveau nasal ou oculaire. Il aurait donc été intéressant de tester ces organes simultanément. La sérologie peut également nous renseigner. Prenons un animal négatif en PCR au niveau du prépuce et du sperme mais ayant des anticorps anti-CHV à la sérologie (cas de la plupart des mâles de notre cohorte). En l'absence de vaccination récente, ceci indique que l'animal est récemment entré en contact avec le virus ou qu'il

l'a « réactivé ». De même, des PCR préputiales, spermatiques, oculaires et nasopharyngées négatives, associées à une sérologie elle-même négative peuvent vouloir simplement dire que le virus est latent et donc non détectable, dans l'organisme de l'animal testé. Il ne semble donc pas possible d'affirmer formellement qu'un animal est indemne du virus, même en cas d'analyses négatives. Cependant, un mâle négatif au niveau du sperme et du prépuce, pourrait être raisonnablement être prélevé afin d'inséminer une chienne, sans que des risques considérables ne soient pris.

3.3.1.5. Questions en suspens et perspectives chez les mâles

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses questions restent en suspens.

3.3.1.5.1. Latence virale

Il semble à ce jour impossible de savoir si un animal négatif en PCR et en sérologie est négatif parce qu'il ne porte pas le virus dans son organisme ou parce que le virus est en latence vraie dans un organe. A ce jour, les lieux de latence du CHV dans l'espèce canine ne sont pas tous connus et de nombreuses incertitudes demeurent. Comme indiqué au paragraphe 2.1.5., le CHV latent peut être retrouvé dans divers organes, particulièrement au niveau de ganglions lymphatiques, comme notamment les ganglions lymphatiques trigéminés, reconnus comme étant des lieux de latence d'herpèsvirus chez d'autres espèces (FHV-1, BoHV-1, EHV-1) (Miyoshi et *al.*, 1998). Les noeuds lymphatiques rétropharyngés, lombo-sacrés, médiastinaux, hypogastriques ou encore les amygdales (Burr et *al.*, 1996) (Miyoshi et *al.*, 1998) (Greene 2012) sont reconnus comme des lieux de latence de ce virus. Par ailleurs, on ne sait pas si le virus peut être latent au niveau de l'appareil reproducteur chez le mâle. La question se pose en effet, puisqu'aucune étude ne s'est intéressée à la potentielle latence du CHV au niveau des testicules. Il serait intéressant, chez un mâle au sperme positif, de prélever ses testicules à un moment où tous les tests PCR réalisables en routine (prépuce, amygdale, sperme ...) sont négatifs, pour rechercher la présence éventuelle de l'ADN de ce virus au sein des testicules (par PCR, hybridation *in situ* ...). En effet, il pourrait être latent au niveau des cellules de Sertoli, de Leydig, des cellules épithéliales du tractus génital ou encore au niveau des spermatogonies. On sait que la croissance optimale de l'herpèsvirus canin se situe autour de 35°C (Carmichael et *al.*, 1969a) (Carmichael et *al.*, 1969b). Or, la position extra-abdominale des testicules

chez le chien leurs confère une température inférieure à la température corporelle de l'animal, ce qui pourrait favoriser le développement du virus. On peut donc légitimement se demander si les testicules des chiens au sperme positif peuvent être un lieu de multiplication et de latence du CHV chez le chien. Ce point mérite donc de plus amples investigations.

3.3.1.5.2. Proposition de protocole pour l'identification de la fraction spermatique porteuse du CHV

Au cours de ce travail, nous avons réussi à mettre en évidence de manière factuelle l'ADN du CHV dans le sperme de 3 mâles (tests à Oniris et tests SCANELIS). Ceci étant, même en tentant de séparer les phases spermatique et liquidienne, les deux sont revenues positives. En partant du principe que le liquide spermatique contient des particules virales correspondant au CHV et que celles-ci peuvent s'accrocher aux cellules spermatiques, malgré une étape de centrifugation, nous avons cherché un moyen de débarrasser ces cellules de potentielles particules virales. Ceci permettrait, après extraction de l'ADN des cellules, de savoir si de l'ADN viral correspondant au CHV se trouve au sein de ces cellules (infection), et non pas à leur surface (adhésion extracellulaire).

En 1992, l'équipe d'Augusto Semperini a mis au point un protocole permettant d'obtenir un sperme exempt de particule virale correspondant au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) alors qu'il était initialement contaminé (Semperini et *al.*, 1992). Ceci a été confirmé par l'absence de séroconversion des receveuses des spermés traités par ce protocole, après une insémination intra-utérine. Reprendre ce protocole pourrait être un moyen de déterminer si l'ADN du CHV que nous avons détecté dans la fraction cellulaire du sperme des 3 mâles positifs est en position intracellulaire. Ainsi, le protocole suivant pourrait être appliqué (Annexe 9). A noter que celui-ci doit être appliqué sur du sperme frais.

Cette question du traitement du sperme contaminé par un alphaherpèsvirus a été posée chez les bovins. (D'angelo et *al.*, 2009). En effet, le sperme de ces derniers peut être contaminé par le BoHV-1. Il a été démontré que l'utilisation de sérum hyperimmun contenant des gammaglobulines est un moyen de limiter le risque de transmission du virus via le sperme tout en n'affectant pas, de manière négative, la fertilité des animaux concernés. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus pourrait donc être une piste potentielle de gestion du virus dans la semence des chiens

excréteurs (Schultz et *al.*, 1998). De plus, l'équipe de Bielanski a mis au point une méthode de lavage du sperme contaminé qui pourrait être testée et éventuellement appliquée dans l'espèce canine. Celle-ci consiste en un nettoyage du sperme avec une solution de trypsine afin de débarasser les spermatozoïdes du virus en position extracellulaire (Bielanski et *al.*, 1988). Une autre étude reprenant ces résultats préconise une utilisation de trypsine à 0,25 %, ce qui permettrait d'éliminer le virus du sperme tout en maintenant l'intégrité des membranes des spermatozoïdes. Il serait donc intéressant de tester ces divers protocoles sur le sperme d'un chien contaminé.

3.3.1.5.3. Durée d'excrétion du CHV dans le sperme

Comme rappelé précédemment, nous avons détecté le CHV dans le sperme total de 3 chiens. Cependant, nous n'avons réalisé qu'un seul prélèvement par animal. Il aurait été intéressant de reprélever ces mâles à intervalle régulier afin d'avoir une idée de la durée d'excrétion. En effet, nous n'avons aucune idée de cette dernière et nous ne savons pas si elle est significativement variable selon les individus et si elle est influencée par de quelconques facteurs.

3.3.2. Détection de l'herpèsvirus canin chez la femelle

3.3.2.1. Détection du CHV chez les femelles

Au cours de cette étude, nous avons pu réaliser des écouvillonnages vaginaux sur 75 femelles d'élevages différents ainsi que des prises de sang (sur toutes ces chiennes sauf une) afin de rechercher la présence du CHV par PCR. Il est apparu que, sur la totalité des femelles testées, 3 sont revenues positives au CHV au niveau vaginal, soit 4%, suite à la réalisation des PCRs temps-réel maison EvaGreen® avec les amorces « LM-gB ». A titre de comparaison, une étude datant de 2020, en Iran, a permis de mettre en évidence le virus les écouvillons vaginaux de 7 des 70 chiennes testées (10%) (Rezaei et *al.*, 2020). La positivité de ces femelles a été confirmée par un laboratoire de référence, SCANELIS, en qPCR Taqman et par la réalisation, en interne, d'une PCR temps-réel Taqman avec les amorces « LED-TK ». Cette parfaite concordance des 3 tests valide en particulier notre test moins coûteux en EvaGreen®. Lorsque nous nous intéressons de plus près à ces trois individus, nous pouvons nous rendre compte d'éléments particuliers.

3.3.2.1.1. Cas de la femelle F-023

La première chienne positive, la F-023, est une chienne Golden Retriever de 1,5 ans, jamais mise à la reproduction, issue d'une mère ayant eu plusieurs avortements et chiots mort-nés. L'éleveur nous rapporte avoir perdu plus d'une centaine de chiots environ 5 ans avant notre passage, lors d'une rupture du vaccin Eurican Herpes 205®. Des autopsies (dont nous n'avons malheureusement pas les résultats), avaient mis en évidence des lésions fortement évocatrices du CHV sur les chiots autopsiés. Nous pouvons donc suspecter plusieurs choses, sans preuve formelle. Tout d'abord, il n'est pas impossible que les problèmes d'avortements et de mortinatalité connus et rapportés pour la mère de la chienne F-023 soient consécutifs à un épisode d'herpèsvirose canine. De plus, il n'est pas improbable que F-023 ait été contaminée lors de la mise-bas par sa mère, mais protégée par des anticorps issus de la vaccination de cette dernière au cours de la gestation. Il n'est cependant pas impossible que cette femelle ait été contaminée au cours de sa vie dans l'élevage, qui a très probablement connu un épisode massif de mortinatalité imputable au CHV et dont les animaux adultes contaminés sont restés dans l'élevage après l'épisode d'il y a 5 ans. Les sérologies réalisées sur certains animaux de cet élevage (Tableau XLIV), mettent en évidence que sur les 12 chiennes testées, seulement 1 présente un titre en dessous du seuil de positivité, ce qui veut dire que 92% de ces chiennes ont très probablement eu un contact récent avec le virus ou l'ont réactivé.

Tableau XLIV : Titres en anticorps anti-CHV chez les animaux testés provenant du même élevage que la femelle F-023

Animal	Titre sérologique
F-018	1/80
F-019	1/80
F-021	1/80
F-022	1/80
F-023	1/80
F-024	1/80
F-026	< 1/20 (négatif)
F-027	1/80
F-069	1/80
F-070	1/80
F-073	1/80
F-075	1/40

Rappelons une nouvelle fois que le vaccin contre le CHV était en rupture depuis plusieurs mois au moment des prélèvements et la chienne n'a jamais été vaccinée contre le CHV. Ainsi, on peut raisonnablement imputer la présence des anticorps anti-CHV à une réaction du système immunitaire de ces animaux face à une infection par ce virus. On peut donc supposer que le virus circule activement dans l'élevage, sans pour autant que les femelles ne l'excrètent systématiquement au niveau vaginal, et sans qu'une virémie ne soit détectée.

3.3.2.1.2. Cas de la femelle F-051

La femelle F-051 est une femelle Basset artésien normand de 6 ans, issue d'un petit élevage particulier, comportant 5 femelles. Le jour des prélèvements, elle a été présentée en consultation pour un contrôle suite à la mise en place d'une glucocorticothérapie à dose immunosuppressive suite à une suspicion de MICI (Maladie Intestinale Chronique Inflammatoire). Lors de l'examen clinique, il est constaté une hyperhémie vulvaire et l'examen rapproché met en évidence des zones d'hémorragies sous-muqueuses. Ces lésions sont parfois retrouvées dans des épisodes de vaginites consécutives au CHV (Greene 2012). Après accord du propriétaire, une prise de sang et des écouvillonnages vaginaux sont réalisés. Nos PCR temps-réel « maison » sont revenues positives à la fois en Taqman et en EvaGreen® et ces résultats ont été confirmés là aussi par le laboratoire SCANELIS, qui a pu évaluer par ailleurs un nombre de copies du génome viral supérieur à 30 millions ($3,24 \cdot 10^7$). L'estimation du nombre de copies présentes dans les deux autres écouvillons vaginaux positifs (F-023 et F-068) n'a pas été possible, ce qui suggère une quantité très importante de CHV dans l'écouvillon prélevé chez la femelle F-051 par rapport aux deux autres. Les PCR temps-réel effectuées sur le sang total de cette chienne sont, en revanche, revenues négatives. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'étude reliant « quantité de virus » et « importance de l'infection ». Il aurait été intéressant de pouvoir prélever les autres animaux de cet élevage, mais ceci n'a pas été possible pour des questions d'organisation de la part de l'éleveur. Ce dernier nous a par ailleurs rapporté des problèmes de fertilité dans son élevage, se traduisant par la difficulté à avoir des chiennes gestantes. De plus, il rapporte deux césariennes sur chiots morts chez deux de ses chiennes dans les 5 dernières années. Il est raisonnable dans ce cas de supposer que l'herpèsvirus canin est probablement responsable d'une partie, voire de la totalité des problèmes reproducteurs de cet

élevage. En outre, rappelons que cette chienne est sous traitement immunosuppresseur afin de juguler les signes cliniques associés à sa maladie intestinale chronique. On peut donc émettre l'hypothèse suivante : l'immunosuppression induite par les glucocorticoïdes administrés aurait permis la sortie de latence du virus et a favorisé les lésions observées sur cette chienne. Cette hypothèse est corroborée par une étude mettant en évidence une sortie de latence du CHV consécutive à l'administration d'une dose immunosuppressive de prednisolone systémique (Ledbetter et *al.*, 2009c). En 1993, Okuda et son équipe ont montré que chez les chiennes adultes ayant des antécédents de troubles de la reproduction dus au CHV, l'administration à forte dose de prednisolone par voie générale provoque une réactivation virale subclinique et une excrétion virale nasale, oculaire, orale et vaginale (Okuda et *al.*, 1993b). Du sang sur tube sec a été prélevé afin de réaliser une sérologie, mais l'hémolyse avancée du prélèvement a malheureusement rendu l'analyse impossible par l'intermédiaire du laboratoire SCANELIS.

3.3.2.1.3. Cas de la femelle F-068

La chienne F-068 est une chienne Rottweiler de 2 ans née d'une portée sans problème de santé apparent, introduite dans l'élevage où elle se trouvait lors des prélèvements, environ 8 semaines avant. Tous les chiots de sa première portée sont morts dans les 5 premiers jours, ce qui a motivé la demande d'une autopsie d'un des chiots auprès d'Autopsie-Service à Oniris. Cette dernière a révélé des lésions très évocatrices du CHV (Annexe 8). Ayant contacté le Service de Reproduction d'Oniris afin d'avoir des renseignements, nous sommes entrés en contact avec l'éleveuse et avons effectué des prélèvements sur son élevage, 4 semaines après la mise-bas de cette femelle. Au total, nous avons pu prélever 17 chiennes. Nos PCR temps-réel sur écouvillons vaginaux ont mis en évidence le virus, uniquement sur la chienne F-068. Comme pour nos autres résultats positifs, ceci a été confirmé par qPCR par le laboratoire SCANELIS. Une étude de 2017 met en évidence que des chiennes malades suite à une infection par le CHV pendant la gestation, sont positives sur écouvillon vaginal 1 semaine *post-partum* puis négatives 3 mois *post-partum* (Piewbang et *al.*, 2017). Nous ne savons cependant pas, à quel moment en théorie, une femelle positive à la mise-bas, devient négative au niveau vaginal. Ici, à un mois *post-partum*, la chienne F-068 était toujours positive. Il aurait été intéressant de la reprélever régulièrement afin de repérer à quel moment nos outils ne permettaient plus la détection du virus au niveau vaginal. Comme pour tous les animaux, nous avons réalisé des PCR temps-réel en EvaGreen® et en Taqman sur sang total pour les chiennes de cet

élevage, en pensant que celles-ci reviendraient probablement négatives. Comme expliqué dans la partie résultats, nous avons obtenu, de façon assez surprenante, un résultat positif, confirmé par électrophorèse (Figure 30). SCANELIS ne réalisant pas de qPCR pour sang total, nos deux tests PCR temps-réel ne sont pas confirmés pour cet échantillon, par un laboratoire de référence. Cependant, en prenant en compte le fait que nos deux différents tests et l'électrophorèse indiquent sans ambiguïté un résultat positif, nous pouvons affirmer que le sang de la chienne F-068 contient effectivement de l'ADN viral correspondant au CHV. De plus, l'éleveuse nous a rapporté que la chienne présentait, 2 semaines avant la mise-bas et jusqu'à celle-ci, une conjonctivite avec épiphora séro-muqueux et un jetage séreux. Nous n'avons malheureusement pas, pour cette étude, réalisé d'écouvillonnages oculaires et nasopharyngés pour détecter le CHV, car focalisés sur la transmission vénérienne. Or, nous savons que l'herpèsvirose canine peut également se présenter sous formes oculaire (paragraphe 2.4.1.3.) et respiratoire (cf paragraphe 2.4.1.1.). On peut donc supposer que les signes exprimés par cette chienne autour de la mise-bas sont imputable au CHV, sans preuve biomoléculaire définitive. Enfin, l'éleveuse nous a recontacté 4 semaines après les prélèvements pour nous informer d'un épisode généralisé de toux du chenil au sein de son élevage, diagnostiqué par son vétérinaire traitant. Nous savons que le CHV peut intervenir dans le syndrome toux de chenil (Kawakami et *al.*, 2010). Il est donc logique de se demander si le CHV a effectivement pu jouer un rôle dans l'épisode décrit par l'éleveuse. Est-ce que l'introduction de la femelle, présentant des signes cliniques oculaires et respiratoires à son arrivée, a pu propager le virus dans l'élevage ? Encore une fois, seules des preuves tangibles, comme la réalisation de PCR sur divers échantillons pourrait nous apporter des réponses. Nous avons cependant pu envoyer des sérums en laboratoire pour réalisation de sérologies (Tableau XLV). Sur les 16 sérums envoyés, 4 sont négatifs en sérologie CHV. Tout comme pour d'autres élevages, les animaux concernés n'ont pas reçu de vaccin depuis plusieurs mois avant les prélèvements, ce qui veut dire que 75% des animaux dont le sérum a été testé ont récemment été en contact avec le virus ou l'ont réactivé.

Tableau XLV : Titres en anticorps anti-CHV chez les animaux testés provenant du même élevage que la femelle F-068

Animal	Titre sérologique
F-052	1/80
F-053	1/20
F-054	1/640
F-055	1/320
F-056	1/20
F-057	< 1/20
F-059	1/20
F-060	1/20
F-061	1/40
F-062	< 1/20
F-063	< 1/20
F-064	1/20
F-065	< 1/20
F-066	1/40
F-067	1/320
F-068	1/160

Les questions suivantes se posent alors : les animaux séropositifs l'étaient-ils avant l'arrivée de la femelle F-068 dans l'élevage ? Cette dernière a-t-elle contaminé l'élevage lors de son introduction ? Cela s'est-il fait par contact oro-nasal ? Par contact avec des matériaux contaminés ? Par contact avec des manipulateurs porteurs, sur leurs mains ou leurs vêtements, du virus ? Nous n'avons malheureusement pas la réponse à ces questions, n'ayant pas d'idée du statut sérologique des chiennes avant l'arrivée de la femelle F-068.

3.3.3. Interprétation des résultats sérologiques

3.3.3.1. Étude sérologique sur chiens d'élevages reproducteurs

3.3.3.1.1. Résultats de notre étude sérologique et comparaison à d'autres études

Nous avons pu récupérer, au cours de ce travail, les sérums de 44 animaux (ce qui veut dire que nous avons assez de sang et que le sérum récupéré était de qualité sur ces chiens). Comme annoncé au paragraphe 3.2.4., sur ces 44 des animaux testés, 36 ont des titres sérologiques positifs pour le CHV, soit près de 82 % des chiens (Tableau VI). Pour rappel, la dernière étude sérologique en France dont nous avons connaissance date de 2002 et concerne des animaux reproducteurs, dont le taux de séropositivité était de presque 31 %. Ce résultat diffère fortement par rapport à ce que nous trouvons. Ceci peut être consécutif à plusieurs facteurs. Tout d'abord, nous ne savons pas combien d'animaux ont été testés en 2002, ni si les animaux ont été prélevés sur tout le territoire français. En ce qui nous concerne, notre échantillon ne prend en compte que des chiens reproducteurs, 100 kilomètres autour de Nantes et dans la région Basse-Normandie. Il serait donc intéressant d'élargir les prélèvements au territoire français dans son intégralité, afin de savoir si notre échantillon était représentatif de la situation globale en France. A travers le monde, le taux de séropositif varie grandement selon les régions, les années de prélèvements et la population étudiée. Ce taux de séropositivité dépend également du statut de l'animal au moment des prélèvements. En effet, un animal avec le virus en latence dans son organisme ne présentera pas d'anticorps sériques, sauf s'il a été vacciné.

3.3.3.1.2. Origine probable des anticorps anti-CHV chez les animaux testés

Ces titres en anticorps peuvent, en théorie, être produits dans deux cas de figure différents. Ces anticorps peuvent tout d'abord être la conséquence de la réponse immunitaire de l'organisme des chiens au contact avec le virus. Ils peuvent cependant également être détectables suite à la production d'anticorps anti-CHV consécutive à la vaccination contre ce virus. Aucun des animaux testés sérologiquement n'a été vacciné dans les 8 mois précédant les prélèvements et ceux pour deux raisons majoritairement. Le vaccin était inaccessible pour ces éleveurs depuis au moins le mois d'août 2021 et les animaux vaccinés ne sont, dans tous les élevages prélevés, que des chiennes au moment de la gestation. Le laboratoire Merial, lors de son dépôt de demande de brevet pour le

vaccin Eurican Herpes 205[®], précise que les anticorps produits en réponse au CHV « persistent peu de temps », sans qu'une valeur exacte ne soit précisée (MERIAL, Société par actions simplifiées 2000). En 2009, Ledbetter et son équipe affirment qu'une sortie de latence du CHV associée à une réactivation virale induit une augmentation des anticorps anti-CHV une semaine après cet événement et que le titre en anticorps diminue ensuite sur plusieurs semaines, sans plus de précision (Ledbetter et *al.*, 2009c). La circulation de ces anticorps peut être retrouvée jusqu'à 8 mois post infection. Nous pouvons donc logiquement supposer que les anticorps détectés chez les animaux testés sérologiquement sont la conséquence d'un contact avec le virus.

3.3.3.2. Interprétation d'un résultat sérologique dans le cadre du CHV

3.3.3.2.1. Animal séropositif

Selon les précisions du laboratoire extérieur ayant réalisé les sérologies, on considère que la sérologie CHV est positive pour une dilution supérieure ou égale à 1/20^{ème}. Si on considère un animal lambda séropositif, 3 cas de figure sont possibles. Tout d'abord, ce titre peut traduire, comme indiqué au-dessus, la production d'anticorps dirigés contre le CHV suite à une vaccination. Un animal qui n'a donc jamais rencontré le virus mais qui a été vacciné contre ce dernier peut être séropositif. D'autre part, il peut présenter un titre en anticorps supérieur au seuil minimal suite à une rencontre avec le virus ; on retrouve alors la trace des anticorps produits en réponse à ce contact récent. Enfin, un animal infecté latent qui réactiverait le virus suite à un stress quelconque (immunosuppression, concours, gestation ...) peut présenter des anticorps dirigés contre le virus sorti de latence. Il est donc impossible, avec une sérologie, de savoir si un animal est contaminé par le virus. De même, l'absence d'anticorps dans le sérum à un instant T n'est pas synonyme d'absence de virus dans l'organisme de l'animal testé.

3.3.3.2.2. Animal séronégatif

Que dire d'un animal séronégatif ? La possible latence du CHV chez un animal rend complexe l'interprétation d'une sérologie herpès. En effet, nous n'avons pas de moyen de savoir si un animal séronégatif l'est parce qu'il n'a jamais rencontré le virus, parce qu'il l'a rencontré mais l'a éliminé,

ou parce qu'il est porteur du virus sous forme latente. On ne peut donc pas, avec une sérologie négative à un instant T, affirmer qu'un animal n'est pas porteur du CHV. Coupler ce résultat à des tests PCR ne permettrait pas de préciser le statut d'un animal donné. En effet, par définition, un virus latent est un virus qui ne se multiplie pas et qui n'est donc pas détectable dans les organes classiques de réplication.

3.3.3.2.3. Distinction anticorps vaccinaux et anticorps en réponse à une infection par le CHV

Il n'est pas possible de distinguer, via une sérologie CHV, si les anticorps titrés correspondent à des anticorps produit en réaction à une vaccination contre le virus ou à une infection par ce dernier. Il est donc extrêmement important de prendre en compte le statut vaccinal d'un animal lors de la lecture des résultats d'une telle sérologie. Nous n'avons pas trouvé d'étude s'intéressant en particulier à la persistance dans le temps des anticorps anti-CHV produit en réponse à une vaccination contre ce dernier. Cependant, il est précisé dans la demande de brevet d'intention pour le vaccin Eurican Herpes 205® de 2000, que les anticorps neutralisants produits « persistent peu de temps », sans plus de précisions (MERIAL, Société par actions simplifiées 2000).

3.3.4. Perspectives, améliorations et utilisation de notre PCR temps-réel Evagreen®

3.3.4.1. Avantages mis en évidence au cours de l'étude

Nous avons pu, à l'aide de nos amorces « LM-gB », utilisées en chimie EvaGreen® mettre en évidence l'ADN viral du CHV dans divers échantillons : du sang total, des cellules vaginales et du sperme. Nous avons pu confirmer nos résultats à posteriori, par le biais d'un laboratoire de référence, SCANELIS à Toulouse, France, utilisant la chimie Taqman avec des amorces et une sonde ciblant le gène de la thymidine kinase virale. Nous avons donc pu, détecter le virus en obtenant les mêmes résultats qu'une technique de référence, par contre plus coûteuse. En effet, l'utilisation

d'une sonde, même si elle rend la réaction plus spécifique en théorie, augmente inévitablement le coût des analyses. A titre de comparaison, si nous souhaitons analyser 100 échantillons (en 3 exemplaires chacun), en prenant en compte les témoins négatifs, les échantillons standards et les échantillons sans matrice, l'analyse en EvaGreen® est environ 60 % moins onéreuse que la Taqman. Dans le cadre d'une étude à grande échelle, notre technique semble équivalente en termes de résultat et plus avantageuse en termes de coût. De plus, elle nous a permis de mettre en évidence pour la première fois la présence du virus dans le sperme de chien. Notre test moins coûteux que celui évoqué ci-dessus est maintenant disponible, d'une part pour continuer l'étude de la circulation du virus sur le terrain (études épidémiologiques), mais aussi d'autre part pour contribuer à la recherche d'organes de latence, notamment chez le mâle (latence dans les cellules de Sertoli ? de Leydig ? ...). Notre test pourra également être très utile pour un travail sur la définition de procédures de lavages ou de traitements (trypsine par exemple) du sperme contaminé, permettant d'éliminer le CHV, avant une procédure d'insémination artificielle sur des animaux de haute valeur génétique et ainsi garantir une maîtrise du risque de transmission en élevage.

3.3.4.2. Améliorations possibles

Nous avons, pour la première fois à notre connaissance, comparé entre eux, deux des tests PCR temps réel Taqman majeurs, publiés à ce jour : celui d'Eric Ledbetter (Ledbetter et *al.*, 2009c) Nicola Decaro (Decaro et *al.*, 2010). Nos analyses sur ADN provenant de cellules MDCK infectées par la souche DK13 du CHV, indiquent une sensibilité accrue d'un \log_{10} en faveur du premier. Il est donc, le test le plus sensible disponible actuellement, et nous pouvons l'utiliser ponctuellement pour des échantillons précieux. Nous avons également retrouvé sa supériorité sur le test Taqman mis au point et utilisé par la Docteure Mélissa Maurière et le Professeur François Meurens (Maurière 2019). Dans le cadre de ce travail, nous avons décidé de mettre au point un nouveau couple d'amorces, utilisable en PCR temps réel Evagreen®, pour la détection du CHV. Nous l'avons comparé également avec les tests Taqman pré-cités. D'après nos différents critères d'analyse, indiqués dans le « Matériels & méthodes », notre test s'avère plus sensible que celui de Decaro, atteignant même sur certaines analyses la limite de détection de celui de Ledbetter. Son intérêt, déjà évoqué, est son coût réduit de moitié, particulièrement pour une analyse à grande échelle. Nos résultats expérimentaux sur prélèvements biologiques montrent aussi que notre test nous permet de détecter l'ADN viral du

CHV lorsqu'il est présent, cela aussi bien que les tests Taqman. Le test de référence (SCANELIS) valide d'ailleurs nos résultats puisqu'il n'y a aucun prélèvement positif dans ce laboratoire qui ne l'est pas entre nos mains. Comme on l'a vu précédemment, lorsqu'on obtient une PCR positive sur nos échantillons, le Cq est toujours inférieur à 38 cycles Il est donc non ambigu, suggérant un risque faible de faux négatif. Bien que nous n'ayons pas de valeur absolue de la limite de détection, cette comparaison inter-tests montre que celle de notre test est très bas, comparable à celle des tests « LED-TK » et « DEC-gB » en Taqman, suggérant donc une sensibilité très élevée de notre test.

Néanmoins, notre test Evagreen ne permet pas, en l'état, de déterminer une charge virale, c'est-à-dire de réaliser une quantification absolue du virus dans un prélèvement (notons que l'intérêt d'une quantification reste limité lorsque l'on cherche simplement à savoir si l'animal testé est infecté ou non). Nous pouvons évidemment évaluer de façon semi-quantitative et relative la charge virale, pour la comparer d'un prélèvement à l'autre : en effet la valeur du Cq reflète la quantité de virus présente dans l'échantillon testé. Un échantillon qui présente un Cq de 15 possède une charge virale considérablement plus forte qu'un autre prélèvement avec un Cq de 30 par exemple (théoriquement, 3,3 cycles de différence entre deux Cq traduisent un delta d'un \log_{10} , en termes de charge virale, c'est-à-dire une « dilution » au dixième).

Nous savons, grâce à notre modèle de cellules MDCK infectées *in vitro*, que nous détectons systématiquement le virus dans une dilution limite (dilution « 10^{-7} »), correspondant théoriquement à $75 \cdot 10^{-7}$ ng d'ADN génomique total (ADN canin en quantité ultra-majoritaire associé à de l'ADN viral du CHV dont la quantité ne nous est pas connue). Ceci correspond à l'évidence à une quantité très faible d'ADN canin, et donc extrêmement plus faible de virus.

Nous savons par ailleurs que le titre viral du surnageant de notre culture de MDCK infectées est au départ de $2,7 \cdot 10^6$ TCID50/mL. Pour rappel, la TCID50 est la « 50% Tissue Culture Infectious Dose » c'est-à-dire la dilution d'un virus nécessaire pour infecter statistiquement 50 % d'une culture cellulaire donnée *in vitro*. Nous n'avons pas travaillé sur les surnageants mais sur les cellules correspondantes, et il est donc difficile d'en déduire la quantité de virus dans l'extrait cellulaire de chaque dilution, à partir de la TCID50 des dilutions « virtuelles » des surnageants correspondants.

Adapter notre technique, pour qu'elle devienne une PCR réellement quantitative, serait un moyen de quantifier la charge virale hébergée au sein d'un prélèvement biologique sur un animal donné. Il

serait ainsi intéressant de disposer d'une solution d'ADN viral pur (amplicon cloné par exemple) pour réaliser des gammes étalons précisant le Cq en fonction de la quantité de génome viral. De telles gammes permettraient de déterminer la limite de détection précise de notre test, et d'évaluer la charge virale des échantillons positifs. Notons toutefois qu'une quantification précise n'est pas toujours possible comme le montre l'analyse SCANELIS qui ne peut quantifier de façon absolue qu'un écouvillon vaginal sur 3 positifs.

Une autre amélioration possible, et d'intérêt de notre test, consisterait à l'adapter à la détection - plus difficile - d'ARNm (ARN messagers) viraux (Q-RT-PCR). En effet, la quantité d'ARN du CHV détectée traduirait le niveau d'amplification virale lors d'une infection active. A l'inverse, l'absence de détection de transcrits dans un prélèvement, en présence du génome viral (PCR temps réel positive), peut traduire quant à elle un état de latence virale. La quantification des ARNm viraux pourrait ainsi préciser une possible latence dans les organes. Ceci nécessite néanmoins des prélèvements invasifs, mais serait par exemple possible pour rechercher une latence au niveau génital lors d'une castration.

3.3.4.3. Choix de la technologie EvaGreen® par rapport à la technologie SybrGreen®

La technique Sybr Green I®, apparue à la fin des années 90 (Morrison et *al.*, 1998) est une technique utilisant des agents de liaison à l'ADN bicaténaire plus sécurisée que celles utilisant du bromure d'éthidium, entre autres. De plus, son faible coût et sa facilité d'utilisation font d'elle une technique plus attractive. Elle est plus sensible que les réactions employant le bromure d'éthidium et semble moins inhiber les réactions de polymérisation (Poitras et *al.*, 2002). Ces arguments en ont fait une technique de premier plan pendant des années. Pourquoi donc travailler en EvaGreen® ici ?

Tout comme la chimie Sybr Green I, la technologie Eva Green est relativement économique. De plus, une étude datant de 2011 a entrepris la comparaison, entre autres, des technologies Sybr Green® et EvaGreen®. Elle a mis en évidence que la technique EvaGreen® est plus efficace concernant les paramètres suivants : effets de la technique sur la température de fusion de l'amplicon, sur l'inhibition de la réaction, sur l'efficacité de la réaction et sur la force du signal fluorescent (Eischeid 2011).

Ces divers points font donc de la technique EvaGreen® une meilleure candidate que la technique SybrGreen® pour la réalisation de PCR temps-réel.

3.3.4.4. Intérêts de la chimie Taqman par rapport à la chimie EvaGreen®

Comme précisé précédemment, la technologie Taqman fait intervenir une sonde particulière qui est complémentaire d'une portion interne au produit d'amplification et qui se situe donc entre les 2 amorces. La technologie PCR EvaGreen®, utilisant un colorant, ne nécessite pas de sonde ce qui la rend légèrement moins onéreuse que la Taqman. Cependant, l'EvaGreen® peut parfois générer un bruit de fond puisqu'il n'y a pas de spécificité de marquage par rapport à une séquence ADN, tout ADN double brin amplifié étant marqué. Le système Taqman® est donc plus spécifique, via l'utilisation d'une sonde. Un autre avantage est que l'on peut multiplier les sondes Taqman, en utilisant divers fluorochromes, ce qui permet d'identifier la présence de mutants au cours de la même analyse, ce qui présente un réel intérêt dans l'étude du génotypage et du polymorphisme de séquences (bien que ce ne soit pas le cas dans notre étude). Ceci étant dit, la spécificité de notre technique EvaGreen® est mise en évidence par la présence d'un unique pic sur le graphique des courbes de dissociations des échantillons positifs (Figure 32).

3.3.5. Gestion du CHV en élevage en fonction des résultats

3.3.5.1. Cas d'un animal négatif en PCR et en sérologie

Un éleveur, dans le cadre d'un dépistage CHV, avant la mise à la reproduction de ses animaux, peut être amené à recevoir des tests PCR négatifs sur un animal également séronégatif. Que faire dans cette situation ? Cela dépend de plusieurs paramètres. Tout d'abord, il faut se rappeler que l'animal en question peut être porteur latent. De plus, il faut savoir sur quels prélèvements les tests PCR ont été effectués. Un animal négatif au niveau des organes reproducteurs peut être positif au niveau de ses amygdales et inversement. Pour mettre toutes les chances de son côté, un éleveur a intérêt à tester, en théorie, tous les sites de multiplication connus. Mais cela a un coût. De plus, rien n'empêche un animal porteur latent du virus, et donc négatif en PCR et en sérologie, d'excréter de

nouveau le CHV entre les prélèvements et les résultats, même si ceux-ci sont rapides. En pratique, un éleveur prend peu de risque à accoupler une femelle séronégative et négative en PCR au niveau des organes testables à un mâle dans la même configuration. Cela doit cependant se faire très rapidement, afin d'éviter une éventuelle réactivation virale ou une contamination avant l'accouplement.

3.3.5.2. Mesures idéales de gestion de la reproduction face au CHV

On comprend assez facilement que, dans l'idéal, il faudrait tester la semence du mâle reproducteur en amont de la reproduction. Pour ce faire, un prélèvement de sperme doit être réalisé et divisé en deux : une partie envoyée en analyse PCR CHV en laboratoire et une partie congelée en l'attente des résultats. Ainsi, si la semence revient négative, elle pourra être utilisée au cours d'une insémination artificielle, qui évite les contacts sexuels entre mâle et femelle. En effet, si la femelle est positive au niveau vaginal et qu'il n'est financièrement pas possible de la tester, le recours à l'insémination artificielle supprime le risque de contamination vénérienne du mâle. Cependant, l'insémination avec un sperme négatif d'une chienne non testée ne permet pas d'écarter la transmission potentielle du virus par la chienne à ses chiots si elle est porteuse. Dans tous les cas, que la femelle soit séronégative ou séropositive, positive en PCR ou non, la vaccination est fortement conseillée. Elle permet la synthèse d'anticorps neutralisants contre une infection en cours ou contre le CHV sorti de latence à la faveur du stress généré par la gestation. Cette vaccination permettra également le transfert passif d'anticorps via le colostrum aux chiots à la naissance et augmenter leurs chances de survie en cas de contact avec le virus. Ils persistent 3 à 4 semaines (MERIAL, Société par actions simplifiées 2000) ce qui favorise la survie des chiots en cas d'infection par le virus, qui, rappelons-le, provoque une forme néonatale systémique, décimant les chiots de moins de 3 semaines. Il pourrait être intéressant de suivre l'excrétion des mâles positifs dans le temps afin d'avoir une idée de la durée d'excrétion dans la semence.

3.3.5.3. Statut de l'élevage et introduction de nouveaux animaux

L'idéal serait de tester sérologiquement des animaux présents dans l'élevage depuis longtemps et non vaccinés. En effet, un animal présent depuis plusieurs mois, aura plus de risques d'être contaminé par le CHV s'il circule dans l'élevage qu'un animal nouvellement introduit. De plus, tester

un animal jamais vacciné contre le CHV ou vacciné il y'a plusieurs mois permet de s'affranchir de la détection d'anticorps vaccinaux qui pourraient être confondus avec des anticorps générés par l'organisme en réponse à une infection par le virus.

A l'introduction d'un nouvel animal, la réalisation d'une sérologie au préalable (en l'absence d'une vaccination récente) couplée à la réalisation de tests PCR (organes génitaux, sperme, amygdales ...), permet d'augmenter les chances d'introduire un animal ne multipliant pas le virus. Cela n'empêche toutefois pas l'introduction toujours possible d'un animal porteur du CHV latent.

3.3.5.4. Portage latent du CHV

Par définition, un animal porteur latent du virus n'excrète pas ce dernier et ne le multiplie pas. Il est donc négatif en PCR et à la sérologie. Même si l'on connaît ou suspecte certains sites de latence (ganglions lymphatiques trigéminés, rétropharyngés, lombo-sacrés, médiastinaux, hypogastriques, les amygdales) (Burr et *al.*, 1996) (Miyoshi et *al.*, 1998) (Greene 2012), il paraît peu concevable en pratique, de biopsier ces possibles lieux de latence à la recherche du CHV. Cela impliquerait d'anesthésier l'animal à tester et de biopsier tous les organes cités pour les analyser. Sans parler du coût considérable que cela représenterait, de l'inconfort pour l'animal et du questionnement éthique que cela impose, rien ne dit que le virus n'est pas latent dans un lieu encore inconnu. Il n'est donc en pratique pas possible de savoir si un animal est porteur latent.

3.3.5.5. Signes d'alertes en élevage

Une nouvelle question se pose donc : quand puis-je suspecter qu'un animal adulte excrète le CHV ? Comme indiqué en deuxième partie, les adultes sont le plus souvent asymptomatiques. Des signes cliniques sont visibles, le plus souvent à la faveur d'une immunodépression. C'était certainement le cas de la chienne positive F-068, qui, 2 semaines avant la mise-bas et jusqu'à celle-ci, présentait une conjonctivite avec épiphora séro-muqueux et un jetage séreux. Ces signes cliniques peuvent correspondre à des atteintes oculo-respiratoires possible lors d'une infection par le CHV. Ainsi, chez des animaux en période de stress (comme une gestation) ou sous traitement immunosuppresseur, il pourrait être intéressant de réaliser des prélèvements lorsque des signes locaux sont présents (écouvillon vaginal en cas de vaginite, oculaire en cas de conjonctivite ou de kératite, nasopharyngé

en cas de jetage ...). De même, en cas d'avortement ou de mortinatalité, le recours à une autopsie d'un des chiots peut être un moyen de suspecter une atteinte par le virus. C'est ce qui a initialement alerté la propriétaire de la chienne F-068, dont les chiots sont morts moins d'une semaine après la mise-bas. L'autopsie d'un des chiots, réalisée à sa demande, a mis en évidence des lésions fortement évocatrices du CHV, ce qui a motivé chez elle une demande plus poussée d'analyses sur le virus et par conséquent notre session de prélèvements au sein de son élevage. Cet événement nous a par conséquent motivé à organiser une « veille » des cas suspects du CHV avec le service Autopsie-Service d'Oniris, afin de récupérer les organes des animaux suspects pour analyse (avec consentement des propriétaires) et potentiellement organiser des campagnes de prélèvements dans les élevages d'où proviennent ces animaux.

3.3.5.6. Intérêt de réaliser des PCR sur le sang des animaux en élevage

Comme nous l'avons vu dans la partie résultats, sur les 92 sangs totaux testés en PCR temps-réel, seul un est revenu positif, le sang total de la femelle F-068, positive en vaginal. On peut donc se poser la question de l'utilité de ce test en particulier. Certaines études le mettent en évidence (Malone et *al.*, 2010) (Castro et *al.*, 2022) tandis que d'autres non (Ronsse et *al.*, 2005) (Ledbetter et *al.*, 2009c). Actuellement, cette recherche n'est d'ailleurs pas proposée dans des laboratoires comme SCANELIS. D'après nos tests, il semble peu pertinent de réaliser des PCR sur sang total, car la seule chienne positive au niveau sanguin l'était aussi en vaginal. Il serait donc plus pertinent de ne pas réaliser cette PCR sur sang total en première intention. De plus, la présence de virus dans le sang total traduit une virémie, dont la durée n'est pas objectivée, on ne sait donc pas si la fenêtre de temps au cours de laquelle le virus est potentiellement détectable dans le sang est longue ou non. Ceci serait intéressant à mieux étudier. L'étape de virémie étant logiquement suivie de la dispersion du virus dans les organes cibles, il semblerait plus pertinent de tester ces derniers.

CONCLUSION

Les objectifs de ce travail étaient multiples. Le premier était de faire un état des lieux très préliminaire de la présence du CHV dans une population de reproducteurs en France et d'en analyser les possibles modalités de transmission vénérienne. Le second était de mettre au point un nouveau test PCR temps réel de détection du virus, sensible, utilisant la chimie EvaGreen® et de le comparer à différents autres tests, en particulier publiés, dans le but de l'utiliser sur un grand nombre d'échantillons. Le dernier était d'identifier d'éventuels facteurs favorisant chez des animaux qui seraient positifs au CHV et d'en déduire des mesures prophylactiques, applicables en élevage.

La mise au point d'un test PCR temps réel ciblant la glycoprotéine gB du CHV s'est avérée d'une sensibilité très proche des tests de références publiés, pour un coût deux fois plus limité (intérêt pour l'analyse de grandes cohortes sur le terrain). Elle nous a déjà permis de tester des écouillons vaginaux, préputiaux, du sperme et du sang total sur près de 100 animaux. Nous avons ainsi pu démontrer que le virus est peu détectable dans les voies génitales d'animaux qui ont eu, pour la grande majorité d'entre eux, un contact avec le virus (séropositifs). Nous avons pu, et ce pour la première fois, mettre formellement en évidence la présence du virus dans le sperme de 3 chiens. Cette découverte nous amène à revoir les modalités de test des animaux avant insémination car nous démontrons ici qu'un animal négatif en PCR au niveau du prépuce peut excréter du virus dans son sperme.

La mise en évidence du CHV dans les phases liquidienne et cellulaire des spermatozoïdes de 3 chiens nous amène également à développer maintenant des protocoles d'une part de séparation stricte des phases, afin de localiser plus précisément le virus, et d'autre part de purification du sperme, pour permettre l'insémination à partir de chiens contaminés mais présentant une haute valeur génétique.

BIBLIOGRAPHIE

ABE, Y., SUWA, Y., YANAGIMOTO-UETA, Y. et SUZUKI, H. (2008). Preimplantation development of embryos in labrador retrievers. *The Journal of reproduction and development*, **54** (2), pp. 135-137.

ALBERT, D. M., LAHAV, M., CARMICHAEL, L. E. et PERCY, D. H. (1976). Canine herpes-induced retinal dysplasia and associated ocular anomalies. *Investigative Ophthalmology*, **15** (4), pp. 267-278.

ALMBERG, E.S., MECH, L.D, SMITH, D. W., SHELDON, J.W. et CRABTREE, R.L. (2009). A Serological Survey of Infectious Disease in Yellowstone National Park's Canid Community. *PLoS ONE*. 4 (9), pp.1-11. DOI [10.1371/journal.pone.0007042](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007042).

AMOROSO, M.G, DI CONCILIO, D., D'ALESSIO, N., VENEZIANO, V., GALIERO, G. et FUSCO, G. (2020). Canine parvovirus and pseudorabies virus coinfection as a cause of death in a wolf (*Canis lupus*) from southern Italy. *Veterinary Medicine and Science*. 6 (3), pp. 600-605. DOI [10.1002/vms3.270](https://doi.org/10.1002/vms3.270).

APPEL, M.J. Virus Infections of Carnivores. In: APPEL, M.J. (1987). Virus infections of vertebrates. New-York : Elsevier, pp. 5-14.

APPEL, M.J., MENEGUS, M., PARSONSON, I.M. et CARMICHAEL, L.E. (1969). Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-week-old pups. *American Journal of Veterinary Research*, **30** (12), pp. 2067-2073.

ASHDOWN, R.R et GILANPOUR, H. (1974). Venous drainage of the corpus cavernosum penis in impotent and normal bulls. *Journal of anatomy*, **117**, (1), pp. 159-170.

AURELIAN, L. (1969). Factors affecting the growth of canine herpesvirus in dog kidney cells. *Applied microbiology*, **17** (1), pp. 179-181.

AZAB, W. et OSTERRIEDER, K. Initial Contact: The First Steps in Herpesvirus Entry. In: OSTERRIEDER, K. (2017). Cell Biology of Herpes Viruses. Berlin: Springer International Publishing. pp. 1-27.

AZAB, W. et OSTERRIEDER, N. (2012). Glycoproteins D of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) and EHV-4 determine cellular tropism independently of integrins. *Journal of virology*. 86 (4), pp. 2031-2044. DOI [10.1128/JVI.06555-11](https://doi.org/10.1128/JVI.06555-11).

BABAEI, H., AKHTARDANESH, B., GHANBARPOUR, R. et NAMJOO, A., (2010). Serological Evidence of Canine Herpesvirus-1 in Dogs of Kerman City, South-east of Iran: Canine Herpesvirus-1 in Dogs of Iran. *Transboundary and Emerging Diseases*. 57 (5), pp. 348-351. DOI [10.1111/j.1865-1682.2010.01155.x](https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01155.x).

BARTSCH, R. C., HUBSCHLE, O. J. et ELS, H. J. (1974). Canine herpesvirus infection: literature review and case report. *Journal of the South African Veterinary Association*, **45** (1), pp. 81-85.

BECK, A. M. et MCENTEE, K. (1966). Subinvolution of placental sites in a postpartum bitch. A case report. *The Cornell veterinarian*, **56** (2), pp. 269-277.

BIBRACK, B. et SCHAUDINN, W. (1976). Untersuchungen über das Vorkommen von Herpesinfektionen bei Hunden in der Bundesrepublik Deutschland mit Hilfe eines Neutralisations-Schnelltestes. *Zentralbl Veterinarmed B*, **23** (5-6), pp. 384- 390.

BIELANSKI, A., LOEWEN, K.G. et HARE, W.C.D. (1988). Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology*. 30 (4), pp. 649-657. DOI [10.1016/0093-691X\(88\)90300-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90300-7).

BRUGGER, N., OTZDORFF, C., WALTER, B., HOFFMANN, B. et BRAUN, J. (2011). Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme-linked Fluorescence Assay: P4 in Canine Blood Serum Using an ELFA. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (5), pp. 870-873. DOI [10.1111/j.1439-0531.2011.01757.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01757.x).

BURR, P.D., CAMPBELL, M.E.M., NICOLSON, L. et ONIONS, D.E. (1996). Detection of Canine Herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*. 53 (3-4), pp. 227-237. DOI [10.1016/S0378-1135\(96\)01227-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01227-8).

BUSTIN, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 25 (2), pp. 169-193. DOI [10.1677/jme.0.0250169](https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169).

CARMICHAEL, L. E. (1970). Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **156** (12), pp. 1714-1721.

CARMICHAEL, L. E., BARNES, F. D. et PERCY, D. H. (1969c). Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. *The Journal of infectious diseases*. 120 (6), pp. 669-678. DOI [10.1093/infdis/120.6.669](https://doi.org/10.1093/infdis/120.6.669).

CARMICHAEL, L. E. et BARNES, F.D. (1969a). Effect of Temperature on Growth of Canine Herpesvirus in Canine Kidney Cell and Macrophage Cultures. *The Journal of Infectious Diseases*, **120** (6), pp. 664-668.

CARMICHAEL, L. E. et BARNES, F. D. (1969b). Temperature as a Factor in Resistance of Young Puppies to Canine Herpesvirus. *The Journal of Infectious Diseases*, **120** (6), pp. 669–78.

CARMICHAEL, L. E., SQUIRE, R. A. et KROOK, L. (1965a). Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. *American journal of veterinary research*, **26** (113), pp. 803-814.

CARMICHAEL, L. E., STRANDBERG, John D. et BARNES, F. D. (1965b). Identification of a Cytopathogenic Agent Infectious for Puppies as a Canine Herpesvirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 120 (3), pp. 644-650. DOI [10.3181/00379727-120-30614](https://doi.org/10.3181/00379727-120-30614).

CASTRO, M.d.S, DAVID, M.B.M., GONÇALVES, E.C., SIQUEIRA, A.S, VIRGULINO, R.R. et AGUIAR, D.C.F. (2022). First molecular detection of canine herpesvirus 1 (CaHV-1) in the Eastern Brazilian Amazon. *Journal of Veterinary Science*. 23 (2), pp. 1-10. DOI [10.4142/jvs.21202](https://doi.org/10.4142/jvs.21202).

CHASTANT-MAILLARD, S., FREYBURGER, L., MARCHETEAU, E., THOUMIRE, S., RAVIER, J.F. et REYNAUD, K. (2012). Timing of the intestinal barrier closure in puppies. *Reproduction in Domestic Animals*. 47, Supplement 6, pp. 190-193. DOI [10.1111/rda.12008](https://doi.org/10.1111/rda.12008).

CHASTANT-MAILLARD, S., REYNAUD, K. et SAINT-DIZIER, M. Particularités de la reproduction chez la chienne. In : SAINT-DIZIER, M., CHASTANT-MAILLARD, M. (2014). La reproduction animale et humaine. Versailles : Éditions Quae. pp. 751.

CHŁOPIK, A. et WYSOKIŃSKA, A. (2019). Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals*. 55 (2), pp. 113-126. DOI [10.1111/rda.13596](https://doi.org/10.1111/rda.13596).

CHRISTIE, D. W. et BELL, E. T. (1971). Endocrinology of the oestrous cycle in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*. 12 (7), pp. 383-389. DOI [10.1111/j.1748-5827.1971.tb06245.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1971.tb06245.x).

CONCANNON, P. W. (1993). Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *Journal of reproduction and fertility*, **47** Supplement, pp. 3-27.

CONCANNON, P. W., YEAGER, A., FRANK, D. et IYAMPILLAI, A. (1990). Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogestagen, mifepristone, in dogs. *Journal of reproduction and fertility*. 88 (1), pp. 99-104. DOI [10.1530/jrf.0.0880099](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880099).

CONCANNON, P.W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*. 124 (3-4), pp. 200-210. DOI [10.1016/j.anireprosci.2010.08.028](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028).

CONCANNON, P.W. (2009). Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (s2), pp. 3-15. DOI [10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x).

CONCANNON, P.W., MCCANN, J.P. et TEMPLE, M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of reproduction and fertility*, **39**, Supplement, pp. 3—25.

CORNWELL, J. C. et WRIGHT, N. G. (1969). Neonatal canine herpesvirus infection: a review of present knowledge. *The Veterinary Record*, **84**, (1), pp. 2-6.

CRIGHTON, G. (2008). Symposium: Neonatal Diseases of the Dog: III: Thermal Regulation in the New-born Dog. *Journal of Small Animal Practice*. 9 (9), pp. 463-472. DOI [10.1111/j.1748-5827.1968.tb04629.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1968.tb04629.x).

D'ANGELO, M., VISINTIN, J.A., RICHTZENHAIN, L.J. et GONÇALVES, R.F. (2009). Evaluation of Trypsin Treatment on the Inactivation of Bovine Herpesvirus Type 1 on *In Vitro* Produced Pre-implantation Embryos. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (3), pp. 536-539. DOI [10.1111/j.1439-0531.2008.01110.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01110.x).

DAHLBOM, M., JOHANSSON, M., MYLLYS, V., TAPONEN, J. et ANDERSSON, M. (2009). Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (1), pp. 128-131. DOI [10.1111/j.1439-0531.2007.01008.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01008.x).

DAVIDSON, A.P. Chapter 16 : Canine Herpesvirus Infection. In : SYKES, J.E. (2014). *Canine and Feline Infectious Diseases*. First Edition. St. Louis : Elsevier, pp 166-169.

DAVIDSON, W.R., APPEL, M.J., DOSTER, G.L., BAKER, O.E. et BROWN, J. F. (1992). DISEASES AND PARASITES OF RED FOXES, GRAY FOXES, AND COYOTES FROM COMMERCIAL SOURCES SELLING TO FOX-CHASING ENCLOSURES. *Journal of Wildlife Diseases*. 28 (4), pp. 581-589. DOI [10.7589/0090-3558-28.4.581](https://doi.org/10.7589/0090-3558-28.4.581).

DAY, M.L., IMAKAWA, K., GARCIA-WINDER, M., ZALESKY, D.D., SCHANBACHER, B.D., KITTOK, R.J. et KINDER, J.E. (1984). Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. *Biology of reproduction*. 31 (2), pp. 332-341. DOI [10.1095/biolreprod31.2.332](https://doi.org/10.1095/biolreprod31.2.332).

DECARO, N., AMORISCO, F., DESARIO, C., LORUSSO, E., CAMERO, M., BELLACICCO, A.L., SCIARRETTA, R., LUCENTE, M.S., MARTELLA, V. et BUONAVOGLIA, C. (2010). Development and validation of a real-

time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *Journal of virological methods*. 169 (1), pp. 176-180. DOI [10.1016/j.jviromet.2010.07.021](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.021).

DECARO, N., MARTELLA, V. et BUONAVOGLIA, C. (2008). Canine Adenoviruses and Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 38 (4), pp. 799-814. DOI [10.1016/j.cvsm.2008.02.006](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.02.006).

DELISLE, F. (1982). Herpesvirose canine. *Recueil de médecine vétérinaire*. 158, pp. 669-675.

DI MARCO LO PRESTI, V., MORENO, A., CASTELLI, A., IPPOLITO, A., ALIBERTI, A., AMATO, B., VITALE, M., FIASCONARO, M. et PRUITI CIARELLO, F. (2021). Retrieving Historical Cases of Aujeszky's Disease in Sicily (Italy): Report of a Natural Outbreak Affecting Sheep, Goats, Dogs, Cats and Foxes and Considerations on Critical Issues and Perspectives in Light of the Recent EU Regulation 429/2016. *Pathogens*. 10 (10), pp. 1301. DOI [10.3390/pathogens10101301](https://doi.org/10.3390/pathogens10101301).

DONOFRIO, G., HERATH, S., SARTORI, C., CAVIRANI, S., FLAMMINI, C.F. et SHELDON, I. M. (2007). Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*. 134 (1), pp. 183-197. DOI [10.1530/REP-07-0065](https://doi.org/10.1530/REP-07-0065).

EBLING, F.J., KUSHLER, R.H. et FOSTER, D.L. (1990). Pulsatile LH secretion during sexual maturation in the female sheep: photoperiodic regulation in the presence and absence of ovarian steroid feedback as determined in the same individual. *Neuroendocrinology*. 52 (3), pp. 229-237. DOI [10.1159/000125591](https://doi.org/10.1159/000125591).

EISA, M., LOUCIF, H., GREVENYNGHE, J. et PEARSON, A. (2021). Entry of the *Varicellovirus Canid herpesvirus 1* into MADIN–DARBY canine kidney epithelial cells is pH -independent and occurs via a macropinocytosis-like mechanism but without increase in fluid uptake. *Cellular Microbiology*. 23 (12). DOI [10.1111/cmi.13398](https://doi.org/10.1111/cmi.13398).

EISCHEID, A.C. (2011). SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Research Notes*. 4 (1), pp. 263. DOI [10.1186/1756-0500-4-263](https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-263).

ENGELS, M., MAYR-BIBRACK, B., RUCKSTUHL, B., METZLER, A. et WYLER, R. (1980). The sero-epizootiology of canine herpes virus infections in Switzerland and preliminary studies with a vaccine. *Zentralblatt fuer Veterinaermedizin. Reihe B*, **27** (4), pp. 257-267.

ENGLAND G.C.W. Physiology and Endocrinology of the Female. In: ENGLAND G.C.W., HEIMENDAHL A. (2010). *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. Second Edition. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, pp. 1-12.

ENGLAND, G. et BURGESS, C. (2003). Survival of dog spermatozoa within the reproductive tract of the bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, **38**, pp. 325-326.

ENGLAND, G. et PACEY, A.A. (1998). Transportation and interaction of dog spermatozoa within the reproductive tract of the bitch; comparative aspects. *Advances in canine reproduction*, **3**, pp. 57-84.

ENGLAND, G.C.W. et ALLEN, W.E. (1992). Factors affecting the viability of canine spermatozoa: I. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology*. **37** (2), pp. 363-371. DOI [10.1016/0093-691X\(92\)90194-V](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90194-V).

ERLES, K. et BROWNLIE, J. (2005). Investigation into the causes of canine infectious respiratory disease: antibody responses to canine respiratory coronavirus and canine herpesvirus in two kennelled dog populations. *Archives of Virology*. **150** (8), pp. 1493-1504. DOI [10.1007/s00705-005-0533-x](https://doi.org/10.1007/s00705-005-0533-x).

ERLES, K., DUBOVI, E. J., BROOKS, H.W. et BROWNLIE J. (2004). Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (10), pp. 4524-4529. DOI [10.1128/JCM.42.10.4524-4529.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4524-4529.2004).

“EURICAN® Herpes 205 Poudre et Solvant Pour Émulsion Injectable.” 2021. Med-Vet. 2021. <https://www.med-vet.fr/medicament-eurican-herpes-205-p2041>

EVANS, H. M. (1931). An introduction to the study of the oestrus cycle in the dog. *Mem. Univ. Calif.*, **9** (2) pp. 65-103.

EVERMANN, J. F., LEAMASTER, B. R., MCELWAIN, T. F., POTTER, K. A., MCKEIRNAN, A. J. et GREEN, J. S. (1984). Natural infection of captive coyote pups with a herpesvirus antigenically related to canine herpesvirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **185** (11), pp. 1288-1290.

EVERMANN, J.F., LEDBETTER, E. C. et MAES, R. K. (2011). Canine Reproductive, Respiratory, and Ocular Diseases due to Canine Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 41 (6), pp. 1097-1120. DOI [10.1016/j.cvsm.2011.08.007](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.08.007).

FARSTAD W.K. Artificial Insemination in Dogs. In: ENGLAND G.C.W., VON HEIMENDAHL A. (2010). BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology. Second Edition. Gloucester : British Small Animal Veterinary Association, pp. 80-88.

FONTBONNE, A. (2011). L'herpès-virose canine. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **164** (4), pp. 331-340.

FORD, R.B. Canine Infectious Respiratory Disease. In: SYKES, J. et GREENE, C. (2011). Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4th Edition. St. Louis: Elsevier. pp. 55-65.

FOSTER, D. L., JACKSON, L. M. et PADMANABHAN, V. (2006). Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 254-255, pp. 109-119. DOI [10.1016/j.mce.2006.04.004](https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.04.004).

FUKUSHIMA, F.B, MALM, C, HENRY, M, GHELLER, V.A, SERAKIDES, R, NEVES, M.M, MACEDO, S.P, FIGUEIREDO, M.S, ANDRADE, M.E.J, CHAVES, M.S, SILVA, M.X, REZENDE, C.M.F et MELO, E.G. (2010). Site of Intrauterine Artificial Insemination in the Bitch does not Affect Sperm Distribution within the Uterus. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (6), pp. 1059-1064. DOI [10.1111/j.1439-0531.2009.01493.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01493.x).

FULTON, R.W., OTT, R.L., DUENWALD, J.C. et GORHAM, J.R. (1974). Serum antibodies against canine respiratory viruses: prevalence among dogs of eastern Washington. *American journal of veterinary research*, **35**, pp 853-855.

GALODE, M. (2014). Essai d'induction des chaleurs avec un implant de desloréline chez la chienne en metœstrus après interruption du cycle au cloprosténol. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, 216 p.

GASKELL, R. et WILLOUGHBY, K. (1999). Herpesviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology*. 69 (1-2), pp. 73-88. DOI [10.1016/S0378-1135\(99\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00092-9).

GAYE, M., NDIAYE, A., DIENG, P.A, NDIAYE, A., BA, P.S, DIATTA, S., CISS, AG., NDOYE, J.M. N., DIOP, M., NDIAYE, A., NDIAYE, M. et DIA, A. (2016). Anatomical bases of external pudendal artery injuries during surgical treatment of pelvic limb varices. *The Pan African medical journal*. 24 (199), pp. 199-199. DOI [10.11604/pamj.2016.24.199.7874](https://doi.org/10.11604/pamj.2016.24.199.7874).

GERSHON, A.A. et GERSHON, M.D. (2013). Pathogenesis and Current Approaches to Control of Varicella-Zoster Virus Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (4), pp. 728-743. DOI [10.1128/CMR.00052-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00052-13).

GERVAIS, K.J., PIRIE, C.G., LEDBETTER, E.C. et PIZZIRANI, S. (2012). Acute primary canine herpesvirus-1 dendritic ulcerative keratitis in an adult dog: Primary CHV-1 dendritic ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology*. 15(2), pp. 133-138. DOI [10.1111/j.1463-5224.2011.00952.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2011.00952.x).

GIBSON, U.E., HEID, C.A et WILLIAMS, P.M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*. 6 (10), pp. 995-1001. DOI [10.1101/gr.6.10.995](https://doi.org/10.1101/gr.6.10.995).

GOBELLO, C. (2014). Prepubertal and pubertal canine reproductive studies: conflicting aspects. *Reproduction in Domestic Animals*. 49 (6), pp. e70-73. DOI [10.1111/rda.12414](https://doi.org/10.1111/rda.12414).

GOGNY A., FIENI F. (2010). Comment réaliser et interpréter une analyse cytologique vaginale chez le chien et le chat. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire canine-féline*, **9** (45), pp. 40-44.

GÓNGORA A.V., SANDOVAL C.H.N. et MANCHEGO S.A. (2007). Evidencia serológica de la presencia del virus herpes Canino tipo 1 en la provincia de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 18 (2), pp. 154-157. DOI [10.15381/rivep.v18i2.1488](https://doi.org/10.15381/rivep.v18i2.1488).

GOWTAGE-SEQUEIRA, S. (2004). The importance of jackals and domestic dogs for the transmission of generalist canid pathogens to sympatric carnivores in Namibia (en ligne) Thèse : Université d'Édimbourg, 318 p.

GRANDAGE, J. (1972). The erect dog penis: a paradox of flexible rigidity. *The Veterinary record*, **91** (6), pp. 141-147.

GREENE, C.E. Canine Herpesvirus Infection. In : GREENE, C.E. (2012) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th Edition. Saint Louis : Elsevier. pp. 48-54.

GUIGAL, P.M., FONTBONNE, A., BUFF, S., VINCETTI, M., THEVENET, F., PAVLOWIEZ, S., GUIOT, A. L., GRANDJEAN, D., et POULET, H. (2002). Prevalence of Antibodies Against Canine Herpes Virus in French Breeding Kennels." *Presses de La Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège*. p.132

HARDER, T.C. et OSTERHAUS, A.D.M.E. (1997). Molecular Characterization and Baculovirus Expression of the Glycoprotein B of a Seal Herpesvirus (Phocid Herpesvirus-1). *Virology*. 227 (2), pp. 343-352. DOI [10.1006/viro.1996.8332](https://doi.org/10.1006/viro.1996.8332).

HASHIMOTO, A., HIRAI, K., SUZUKI, Y. et FUJIMOTO, Y. (1983). Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *American journal of veterinary research*, **44** (4), pp. 610-614.

HASHIMOTO, A., HIRAI, K., YAMAGUCHI, T. et FUJIMOTO, Y. (1982). Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *American journal of Veterinary Research*, **43** (5), pp. 844-850.

HEBIA-FELLAH, I., LÉAUTÉ, A., FIÉNI, F., ZIENTARA, S., IMBERT-MARCILLE, B.M., BESSE, B., FORTIER, G., PRONOST, S., MISZCZAK, F., FERRY, B., THORIN, C., PELLERIN, J.J. et BRUYAS, J.F. (2009). Evaluation of the presence of equine viral herpesvirus 1 (EHV-1) and equine viral herpesvirus 4 (EHV-4) DNA in stallion semen using polymerase chain reaction (PCR). *Theriogenology*. 71 (9), pp. 1381-1389. DOI [10.1016/j.theriogenology.2009.01.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.009).

HILL, H. et MARÉ, C. J. (1974). Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*, **35** (5), pp. 669-672.

HOARAU, M. (1997). Les prostaglandines en gynécologie-obstétrique : de l'interruption de grossesse au déclenchement artificiel du travail. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Grenoble : Université Joseph FOURIER – Grenoble I, 155p.

HUSSEY, G.S. et LANDOLT, G. A. Equine Alphaherpesviruses. In : SPRAYBERRY, K.A. et ROBINSON, N.E. (2015). *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine*. 7th Edition. Elsevier. pp. 158-161.

HUXSOLL, D. L. et HEMELT, I. E. (1970). Clinical observations of canine herpesvirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **156** (12), pp. 1706-1713.

JAGER, M.C., SLOMA, E. A., SHELTON, M. et MILLER, A.D. (2017). Naturally Acquired Canine Herpesvirus-Associated Meningoencephalitis. *Veterinary Pathology*. 54 (5), pp. 820-827. DOI [10.1177/0300985817716263](https://doi.org/10.1177/0300985817716263).

JEFFCOATE, I. A. et LINDSAY, F. E. (1989). Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *Journal of reproduction and fertility*. **39**, Supplement, pp. 277-287.

JOHANNES, J.E., 2003. The Basenji Annual Estrus: The impact of the rainforest ecology on its development. *The Basenji*, **39** (1), pp 34-5.

JOHNSTON, S. D., ROOT KUSTRITZ, M. V., OLSON, P. S. Canine Pregnancy. In : JOHNSTON, S. D., ROOT KUSTRITZ, M. V., & OLSON, P. S. (2001). *Canine and feline theriogenology*. First Edition. Philadelphia: Saunders, pp 66-104.

KAKUK, T. J., CONNER, G. H., LANGHAM, R. F., MOORE, J. A. et MITCHELL, J. R. (1969). Isolation of a canine herpesvirus from a dog with malignant lymphoma. *American journal of veterinary research*, **30** (11), pp. 1951-1960.

KARPAS, A., GARCIA, F. G., CALVO, F. et CROSS, R.E. (1968). Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **29** (6), pp. 1251-1257.

KAWAKAMI, K., OGAWA, H., MAEDA, K., IMAI, A., OHASHI, A., MATSUNAGA, S., TOHYA, Y., OHSHIMA, T. et MOCHIZUKI, M. (2010). Nosocomial Outbreak of Serious Canine Infectious Tracheobronchitis (Kennel Cough) Caused by Canine Herpesvirus Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (4), pp. 1176-1181. DOI [10.1128/JCM.02128-09](https://doi.org/10.1128/JCM.02128-09).

KHUSRO, A., AARTI, C., RIVAS-CACERES, R.R et BARBABOSA-PLIEGO, A. (2020). Equine Herpesvirus-1 Infection in Horses: Recent Updates on its Pathogenicity, Vaccination, and Preventive Management Strategies. *Journal of Equine Veterinary Science*. 87, pp. 102923. DOI [10.1016/j.jevs.2020.102923](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102923).

KIMBER, K. R., KOLLIAS, G. V. et DUBOVI, E. J. (2000). Serologic survey of selected viral agents in recently captured wild North American river otters (*Lontra canadensis*). *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. 31 (2), pp. 168-175. DOI [10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0168:SSOSVA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0168:SSOSVA]2.0.CO;2).

KLUGE, J. P. et MARÉ, C. J. (1974). Swine pseudorabies: abortion, clinical disease, and lesions in pregnant gilts infected with pseudorabies virus (Aujeszky's disease). *American Journal of Veterinary Research*. **35** (7), pp. 991-995.

KOLB, A.W., LEWIN, A. C., MOELLER TRANE, R., MCLELLAN, G.J. et BRANDT, C.R. (2017). Phylogenetic and recombination analysis of the herpesvirus genus varicellovirus. *BMC Genomics*. 18 (1), pp. 887. DOI [10.1186/s12864-017-4283-4](https://doi.org/10.1186/s12864-017-4283-4).

KROGENÆS, A., ROOTWELT, V., LARSEN, S., SJØBERG, E.K., AKSELSEN, B., SKÅR, T.M., MYHRE, S.S., RENSTRÖM, L.H.M., KLINGEBORN, B. et LUND, A. (2012). A serologic study of canine herpes virus-1 infection in the Norwegian adult dog population. *Theriogenology*. 78 (1), pp.153-158. DOI [10.1016/j.theriogenology.2012.01.031](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.031).

KROGENÆS, A., ROOTWELT, V., LARSEN, S., RENSTRÖM, L., FARSTAD, W. et LUND, A. (2014). A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 56 (19). DOI [10.1186/1751-0147-56-19](https://doi.org/10.1186/1751-0147-56-19).

KUMAR, S., DRISKELL, E. A., COOLEY, A. J., JIA, K., BLACKMON, S., WAN, X.-F., UHL, E. W., SALIKI, J. T., SANCHEZ, S., KRIMER, P. M. et HOGAN, R. J. (2015). Fatal Canid Herpesvirus 1 Respiratory Infections in 4 Clinically Healthy Adult Dogs. *Veterinary Pathology*. 52 (4), pp.681-687. DOI [10.1177/0300985814556190](https://doi.org/10.1177/0300985814556190).

LACHERETZ, A. et COGNARD, S. (1998). Epidémiologie et diagnostic sérologique de l'herpès-virose canine. *Rev. Méd. Vét.*, **149**, pp. 853-856.

LAMM, C.G. et MAKLOSKI, C.L. (2012). Current advances in gestation and parturition in cats and dogs. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*. 42 (3), pp.445-456. DOI [10.1016/j.cvsm.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.010).

LARSEN, R.W, KIUPEL, M., BALZER, H.J et AGERHOLM, J.S. (2015). Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2015. 57 (1). DOI [10.1186/s13028-014-0092-9](https://doi.org/10.1186/s13028-014-0092-9).

LAVAN, R. et KNESEL, O. (2015). Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters. *Journal of Small Animal Practice*. 56 (9), pp. 572-576. DOI [10.1111/jsap.12389](https://doi.org/10.1111/jsap.12389).

LEA, R. et ENGLAND, G. C.W. Puberty and Seasonality. In : NOAKES, D.E., PARKINSON, T.J. et ENGLAND, G.C.W. (2019). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th Edition. St. Louis: W.B. Elsevier. pp. 54-62.

LEDBETTER, E.C., DA SILVA, E.C., KIM, S.G., DUBOVI, E.J. et SCHWARK, W.S. (2012). Frequency of spontaneous canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding in latently infected dogs and canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding induced by topical administration of cyclosporine and systemic administration of corticosteroids. *American Journal of Veterinary Research*. 73 (7), pp. 1079-1084. DOI [10.2460/ajvr.73.7.1079](https://doi.org/10.2460/ajvr.73.7.1079).

LEDBETTER, E.C., DUBOVI, E.J., KIM, S.G., MAGGS, D.J. et BICALHO, R.C. (2009a). Experimental primary ocular canine herpesvirus-1 infection in adult dogs. *American journal of veterinary research*. 70 (4), pp. 513-521. DOI [10.2460/ajvr.70.4.513](https://doi.org/10.2460/ajvr.70.4.513).

LEDBETTER, E.C., HORNBUCKLE, W.E. et DUBOVI, E.J. (2009b). Virologic survey of dogs with naturally acquired idiopathic conjunctivitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 235 (8), pp. 954-959. DOI [10.2460/javma.235.8.954](https://doi.org/10.2460/javma.235.8.954).

LEDBETTER, E.C., KIM, S.G., DUBOVI, E.J. et BICALHO, R.C. (2009c). Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary Microbiology*. 138 (1-2), pp. 98-105. DOI [10.1016/j.vetmic.2009.03.013](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.013).

LEDBETTER, E.C., NICKLIN, A.M., SPERTUS, C.B., PENNINGTON, M.R., VAN DE WALLE, G.R. et MOHAMMED, H.O. (2018). Evaluation of topical ophthalmic ganciclovir gel for the treatment of dogs with experimentally induced ocular canine herpesvirus-1 infection. *American Journal of Veterinary Research*. 79 (7), pp. 762-769. DOI [10.2460/ajvr.79.7.762](https://doi.org/10.2460/ajvr.79.7.762).

LEE, W-Y., LEE, R., PARK, H-J., DO, J.T., PARK, C., KIM, J-H., JHUN, H., LEE, J-H., HUR, T. et SONG, H. (2017). Characterization of male germ cell markers in canine testis. *Animal Reproduction Science*. 182, pp. 1-8. DOI [10.1016/j.anireprosci.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.002).

LEGAULT, P. (2007). Le diagnostic de l'herpès-virose canine en élevage : sérologie ou PCR ? Bilan des données de bibliographie dans les différentes espèces. Thèse de Médecine Vétérinaire. Alfort . 72 pages.

LEHTI, M. S. et SIRONEN, A. (2016). Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)*. 151 (4), pp. 43-54. DOI [10.1530/REP-15-0310](https://doi.org/10.1530/REP-15-0310).

LEWIN, A. C., COGHILL, L.M., MIRONOVICH, M., LIU, C.C, CARTER, R.T. et LEDBETTER, E.C. (2020). Phylogenomic Analysis of Global Isolates of Canid Alphaherpesvirus 1. *Viruses*. 12 (12), pp. 1421. DOI [10.3390/v12121421](https://doi.org/10.3390/v12121421).

LI, Y., NEGUSSIE, H., QIU, Y., REDDY, V.R.A.P., MATEUSEN, B. et NAUWYNCK, H.J. (2016). Early events of canine herpesvirus 1 infections in canine respiratory and genital mucosae by the use of ex vivo models. *Research in Veterinary Science*. 105, pp. 205-208. DOI [10.1016/j.rvsc.2016.02.019](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.019).

LIMCUMPAO, J. A., HORIMOTO, T., XUAN, X., TAKAHASHI, E. et MIKAMI, T., (1990). Immunological relationship between feline herpesvirus type 1 (FHV-1) and canine herpesvirus (CHV) as revealed by polyvalent and monoclonal antibodies. *Archives of Virology*. 111 (3-4), pp.165-176. DOI [10.1007/BF01311051](https://doi.org/10.1007/BF01311051).

LINDE-FORSBERG, C. (1991). Achieving Canine Pregnancy by Using Frozen or Chilled Extended Semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 21 (3), pp.467-485. DOI [10.1016/S0195-5616\(91\)50054-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50054-1).

LOUBIERE A.S.D. (2010). L'ontogénèse chez une espèce "nidicole", le chien, *Canis familiaris*. Thèse de doctorat vétérinaire. Paris : École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 39 p.

LOSURDO, M., DOWGIER, G., LUCENTE, M.S., CINONE, M., CAMERO, M., COLAIANNI, M.L., PASSANTINO, G., VENTRIGLIA, G., BUONAVOGLIA, D. et DECARO, N. (2018). Long-term shedding of Canine alphaherpesvirus 1 in naturally infected newborn pups. *Research in Veterinary Science*. 119, pp. 244-246. DOI [10.1016/j.rvsc.2018.07.001](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.07.001).

LUNDGREN, D.L et CLAPPER, W.E. (1969). Neutralization of canine herpesvirus by dog and human serums: a survey. *American Journal of Veterinary Research*, **30** (3), pp 479-482.

LUST, G. et CARMICHAEL, L. E. (1971). Suppressed synthesis of viral DNA, protein, and mature virions during replication of canine herpesvirus at elevated temperature. *The Journal of infectious diseases*, **124** (6), pp. 572-580.

LUST, G. et CARMICHAEL, L. E. (1974). Properties of Canine Herpesvirus DNA. *Experimental Biology and Medicine*, **146** (1), pp. 213-217.

MAES, R. (2012). Felid herpesvirus type 1 infection in cats: a natural host model for alphaherpesvirus pathogenesis. *ISRN Veterinary Science*. 2012, pp. 495830. DOI [10.5402/2012/495830](https://doi.org/10.5402/2012/495830).

MALONE, E.K., LEDBETTER, E.C., RASSNICK, K.M., KIM, S.G. et RUSSELL, D. (2010). Disseminated Canine Herpesvirus-1 Infection in an Immunocompromised Adult Dog: Herpesvirus in a Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24 (4), pp. 965-968. DOI [10.1111/j.1939-1676.2010.0512.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0512.x).

MANNING, A., BUCHAN, A., SKINNER, G. R., DURHAM, J. et THOMPSON, H. (1988). The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesviruses. *The Journal of General Virology*. 69 (7), pp. 1601-1608. DOI [10.1099/0022-1317-69-7-1601](https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1601).

MARIN, M.S., QUINTANA, S., LEUNDA, M.R., RECAVARREN, M., PAGNUCO, I., SPÄTH, E., PÉREZ, S. et ODEÓN, A. (2016). A new method for simultaneous detection and discrimination of Bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) using real time PCR with high resolution melting (HRM) analysis. *Journal of Virological Methods*. 227, pp. 14-22. DOI [10.1016/j.jviromet.2015.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.10.005).

MARTINA, B. E. E., HARDER, T. C. et OSTERHAUS, A. D. M. E. (2003). Genetic characterization of the unique short segment of Phocid herpesvirus type 1 reveals close relationships among alphaherpesviruses of hosts of the order Carnivora. *Journal of General Virology*. 84 (6), pp. 1427-1430. DOI [10.1099/vir.0.19005-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.19005-0).

MASON, S.J. (2017). A retrospective clinical study of endoscopic-assisted transcervical insemination in the bitch with frozen–thawed dog semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 52 (S2), pp. 275-280. DOI [10.1111/rda.12864](https://doi.org/10.1111/rda.12864).

MASON, S.J. (2018). Current Review of Artificial Insemination in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 48 (4), pp. 567-580. DOI [10.1016/j.cvsm.2018.02.005](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.005).

MASON, S.J. et ROUS, N.R. (2014). Comparison of endoscopic-assisted transcervical and laparotomy insemination with frozen-thawed dog semen: A retrospective clinical study. *Theriogenology*. 82 (6), pp. 844-850. DOI [10.1016/j.theriogenology.2014.06.014](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.014).

MAURIERE M. (2019). Détection de l'herpèsvirus canin par PCR quantitative dans l'éjaculat et les testicules chez le chien. Thèse de doctorat vétérinaire. Oniris – École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes- Atlantique, 132p.

MAYR, A. et MAYR, B. (1999). A new concept in prophylaxis and therapy: paramunization by poxvirus inducers. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 19 (3-4), pp. 91-98. DOI [10.1590/S0100-736X1999000300001](https://doi.org/10.1590/S0100-736X1999000300001).

MERIAL, Société par actions simplifiées. VACCINATION CONTRE L'HERPESVIROSE CANINE ET VACCINS. Hervé POULET. Demandé le : 21.01.2000. Demande de Brevet d'invention : 2 804 026.

MIYOSHI, M., ISHII, Y., TAKIGUCHI, M., TAKADA, A., YASUDA, J., HASHIMOTO, A., OKAZAKI, K. et KIDA, H. (1998). Detection of Canine Herpesvirus DNA in the Ganglionic Neurons and the Lymph Node Lymphocytes of Latently Infected Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 61 (4), pp. 375-379. DOI [10.1292/jvms.61.375](https://doi.org/10.1292/jvms.61.375).

MOLESAN, A., GOODMAN, L., FORD, J., LOVERING, S. J. et KELLY, K. (2019). The Causes of Canine Myocarditis and Myocardial Fibrosis Are Elusive by Targeted Molecular Testing: Retrospective Analysis and Literature Review. *Veterinary pathology*. 56 (5), pp. 761-777. DOI [10.1177/0300985819839241](https://doi.org/10.1177/0300985819839241).

MONESI, V. (1971). Chromosome activities during meiosis and spermiogenesis. *Journal of reproduction and fertility*, **13**, Supplement, pp. 1-14.

MONTEIRO, F.L., CARGNELUTTI, J.F., MARTINS, M., ANZILIERO, D., ERHARDT, M. Martins, WEIBLEN, R. et FLORES, E.F. (2016). Detection of respiratory viruses in shelter dogs maintained under varying environmental conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47 (4), pp. 876-881. DOI [10.1016/j.bjm.2016.07.002](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.002).

MORRISON, T. B., WEIS, J. J. et WITTEWER, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, **24** (6), pp. 952-962.

MUNDY, P., DA SILVA, E.C. et LEDBETTER, E.C (2012). Effects of cyclophosphamide myelosuppression in adult dogs with latent canine herpesvirus-1 infection. *Veterinary Microbiology*. 159 (1-2), pp. 230-235. DOI [10.1016/j.vetmic.2012.03.019](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.019).

MUSTONEN, K., MUSTAKANGAS, P., VALANNE, L., HALTIA, M. et KOSKINIEMI, M. (2001). Congenital Varicella-Zoster Virus Infection After Maternal Subclinical Infection: Clinical and Neuropathological Findings. *Journal of Perinatology*. 21 (2), pp. 141-146. DOI [10.1038/sj.jp.7200508](https://doi.org/10.1038/sj.jp.7200508).

MUTEMBEI, H. M., MUTIGA, E. R. et TSUMA, V. T. (2000). A retrospective study on some reproductive parameters of German shepherd bitches in Kenya. *Journal of the South African Veterinary Association*. 71 (2), pp. 115-117. DOI [10.4102/jsava.v71i2.692](https://doi.org/10.4102/jsava.v71i2.692).

MUYLKENS, B., THIRY, J., KIRTEN, P., SCHYNTS, F. et THIRY, E., 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*. 38 (2), pp. 181-209. DOI [10.1051/vetres:2006059](https://doi.org/10.1051/vetres:2006059).

NAKAMICHI, K., OHARA, K., MATSUMOTO, Y. et OTSUKA, H. (2000). Attachment and penetration of canine herpesvirus 1 in non-permissive cells. *The Journal of veterinary medical science*. 62 (9), pp. 965-970. DOI [10.1292/jvms.62.965](https://doi.org/10.1292/jvms.62.965).

NICKLIN, A.M., MCENTEE, M.C. et LEDBETTER, E.C. (2014). Effects of ocular surface strontium-90 beta radiotherapy in dogs latently infected with canine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology*. 174 (3-4), pp. 433-437. DOI [10.1016/j.vetmic.2014.10.029](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.10.029).

NIO, M. (2013). Essai d'induction des chaleurs chez la chienne en anoestrus précoce à l'aide d'un implant de Desloréline pendant deux semaines. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Nantes : Faculté de Médecine, 154p.

NOAKES, D.E. Physiology of the Puerperium. In: NOAKES, D.E., PARKINSON, T.J. et ENGLAND, G.C.W. (2019). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th Edition. St. Louis: W.B. Elsevier. pp. 148-156.

NÖTHLING, J.O., HÜSSY, D., STECKLER, D. et ACKERMANN, M. (2008). Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. *Theriogenology*. 69 (3), pp. 276-282. DOI [10.1016/j.theriogenology.2007.09.022](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.022).

O'DONNELL, L., NICHOLLS, P. K., O'BRYAN, M.K., MCLACHLAN, R.I. et STANTON, P.G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*. 1 (1), pp. 14-35. DOI [10.4161/spmg.1.1.14525](https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525).

OKKENS, A.C. et KOOISTRA, H.S. (2006). Anestrus in the Dog: a Fascinating Story. *Reproduction in Domestic Animals*. 41 (4), pp. 291-296. DOI [10.1111/j.1439-0531.2006.00702.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00702.x).

OKONKOWSKI, L. K., SZLOSEK, D., OTTNEY, J., COYNE, M. et CAREY, S. A. (2021). Asymptomatic carriage of canine infectious respiratory disease complex pathogens among healthy dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 62 (8), pp. 662-668. DOI [10.1111/jsap.13378](https://doi.org/10.1111/jsap.13378).

OKUDA, Y., HASHIMOTO, A., YAMAGUCHI, T., FUKUSHI, H., MORI, S., TANI, M., HIRAI, K. et CARMICHAEL, L.E. (1993a). Repeated canine herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. *The Cornell veterinarian*, **83** (4), pp. 291-302.

OKUDA, Y., ISHIDA, K., HASHIMOTO, A., YAMAGUCHI, T., FUKUSHI, H., HIRAI, K. et CARMICHAEL, L. E. (1993b). Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection. *American Journal of Veterinary Research*. **54** (4), pp. 551-554.

OSTERHAUS, A., VRIES, J.B. et STEUR, K. (1977). Antiviral Antibodies in Dogs in the Netherlands. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. 24 (2), pp. 123-133. DOI [10.1111/j.1439-0450.1977.tb00982.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1977.tb00982.x).

PAPAGEORGIU, K.V., SUÁREZ, N.M., WILKIE, G.S., MCDONALD, M., GRAHAM, E.M. et DAVISON, A.J. (2016). Genome Sequence of Canine Herpesvirus. *PloS One*. 11 (5), pp. 1-11. DOI [10.1371/journal.pone.0156015](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156015).

PARKINSON, T.J. Reproductive Physiology of Male Animals. In: NOAKES, D.E., PARKINSON, T.J. et ENGLAND, G.C.W. (2019). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th Edition. St. Louis: W.B. Elsevier. pp. 35-53

PARZEFALL, B., FISCHER, A., BLUTKE, A., SCHMAHL, W. et MATIASEK, K. (2011). Naturally-occurring canine herpesvirus-1 infection of the vestibular labyrinth and ganglion of dogs. *The Veterinary Journal*. 189 (1), pp. 100-102. DOI [10.1016/j.tvjl.2010.06.014](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.014).

PERCY, D. H., CARMICHAEL, L. E., ALBERT, D. M., KING, J. M. et JONAS, A. M. (1971). Lesions in Puppies Surviving Infection with Canine Herpesvirus. *Veterinary Pathology*. 8 (1), pp. 37-53. DOI [10.1177/030098587100800106](https://doi.org/10.1177/030098587100800106).

PIEWBANG, C., RUNGSIPIPAT, A., POOVORAWAN, Y. et TECHANGAMSUWAN, S. (2016). Development and application of multiplex PCR assays for detection of virus-induced respiratory disease complex in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 78 (12), pp. 1847-1854. DOI [10.1292/jvms.16-0342](https://doi.org/10.1292/jvms.16-0342).

PIEWBANG, C., RUNGSIPIPAT, A., POOVORAWAN, Y. et TECHANGAMSUWAN, S. (2017). Viral molecular and pathological investigations of *Canid herpesvirus 1* infection associated respiratory disease and acute death in dogs. *Acta Veterinaria*. 67 (1), pp. 11-24. DOI [10.1515/acve-2017-0002](https://doi.org/10.1515/acve-2017-0002).

POITRAS, E. et Alain HOUDE (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, **2** (2), pp. 2-11.

POSTE, G. et KING, N. (1971). Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. *The Veterinary record*. 88 (9), pp. 229-233. DOI [10.1136/vr.88.9.229](https://doi.org/10.1136/vr.88.9.229).

POUILLE-VIDAL, M. (2020). Synthèse de la littérature sur les risques de maladies virales inter-espèces en élevage canin en France. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Faculté de Médecine de Toulouse. École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France, 132 p.

POULET, H. (2005). Actualités et questions sur l'herpès-virose canine. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 158 (4), pp. 353-361. DOI [10.4267/2042/47789](https://doi.org/10.4267/2042/47789).

PRATELLI, A., COLAO, V. et LOSURDO, M. (2014). Serological and virological detection of canine herpesvirus-1 in adult dogs with and without reproductive disorders. *The Veterinary Journal*. 200 (2), pp. 257-260. DOI [10.1016/j.tvjl.2014.03.001](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.001).

PRETZER, S.D. (2008). Canine embryonic and fetal development: A review. *Theriogenology*. 70 (3), pp. 300-303. DOI [10.1016/j.theriogenology.2008.04.029](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.029).

QUARTUCCIO, M., BIONDI, V., LIOTTA, L. et PASSANTINO, A. (2020). Legislative and ethical aspects on use of canine artificial insemination in the 21st century. *Italian Journal of Animal Science*. 19 (1) pp. 630-643. DOI [10.1080/1828051X.2020.1775503](https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1775503).

READING, M. J. et FIELD, H. J. (1998). A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. *Archives of Virology*. 143 (8), pp. 1477-1488. DOI [10.1007/s007050050391](https://doi.org/10.1007/s007050050391).

REECE, W. O. Male Reproduction. In: REECE, W. O. (2009). *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. Fourth Edition. Ames: Wiley Blackwell, pp.432-457.

REECE, W.O. Female Reproduction in Mammals. In: REECE, W.O., HOWARD, H.E., JESSE, P.G. et ETSURO, E.U. (2015) *Duke's Physiology of Domestic Animals*. Thirteenth Edition. Iowa : Wiley Blackwell, pp. 670-693

RÉMOND, M., SHELDRIK, P., LEBRETON, F. et FOULON, T. (1995). Sequence of the canine herpesvirus thymidine kinase gene: taxon-preferred amino acid residues in the alphaherpesviral thymidine kinases. *Virus Research*. 39 (2-3), pp. 341-354. DOI [10.1016/0168-1702\(95\)00089-5](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00089-5).

REZAEI, M., JAJARMI, M., ALIZADEH, R., KHALILI, M. et BABAEI, H. (2020). First molecular study of Canine herpesvirus-1 in reproductive specimens of adult dogs in southeast of Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 71, pp. 101487. DOI [10.1016/j.cimid.2020.101487](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101487).

RICKARD, V. Chapter 2 - Birth and the First 24 Hours. In: PETERSON, M.E. et KUTZLER, M.A. (2011). *Small Animal Pediatrics*. Saint Louis: W.B. Saunders, pp. 11-19.

RIJSEWIJK, F.A.M, LUITEN, E.J.J., DAUS, F., VAN DER HEIJDEN, R.W. et VAN OIRSCHOT, J.T. (1999). Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997–1998. *Veterinary Microbiology*. 65 (1), pp. 1-7. DOI [10.1016/S0378-1135\(98\)00285-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00285-5).

RIJSSELAERE, T., ENGLAND, G.C.W., FREEMAN, S.I., MAES, D. et VAN SOOM, A. (2014). Current Knowledge on the Transport and Fate of Spermatozoa in the Reproductive Tract of the Bitch. *Reproduction in Domestic Animals*. 49 (S2), pp. 2-7. DOI [10.1111/rda.12299](https://doi.org/10.1111/rda.12299).

RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A., VAN CRUCHTEN, S., CORYN, M., GÖRTZ, K., MAES, D. et DE KRUIF, A. (2004). Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation. *Reproduction*. 128 (6), pp. 801-811. DOI [10.1530/rep.1.00273](https://doi.org/10.1530/rep.1.00273).

ROBINSON, A. J., CRERAR, S. K., WAIGHT SHARMA, N., MÜLLER, W. J. et BRADLEY, M. P. (2005). Prevalence of serum antibodies to canine adenovirus and canine herpesvirus in the European red fox (*Vulpes vulpes*) in Australia. *Australian veterinary journal*. 83 (6), pp. 356-361. DOI [10.1111/j.1751-0813.2005.tb15634.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2005.tb15634.x).

ROBINSON, B. et NOAKES, D.E. Reproductive Physiology of the Female. In : NOAKES, D.E., PARKINSON, T.J. et ENGLAND, G.C.W. (2019). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th Edition. St. Louis : W.B. Elsevier. pp. 2-34.

ROIZMAN, B. et WHITLEY, R. J., 2001. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes: the journal of the IHMF*, **8** (1), pp. 23-27.

RON SSE, V., VERSTEGEN, J., ONCLIN, K., GUIOT, A.I., AEBERLE, C., NAUWYNCK, H.J. et POULET, H. (2002). Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 in the Belgian Dog Population in 2000. *Reproduction in Domestic Animals*. 37 (5), pp. 299-304. DOI [10.1046/j.1439-0531.2002.00363.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00363.x).

RON SSE, V., VERSTEGEN, J., ONCLIN, K., FARNIR, F. et POULET, H. (2004). Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology*. 61 (4), pp. 619-636. DOI [10.1016/S0093-691X\(03\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00249-8).

RON SSE, V., VERSTEGEN, J., THIRY, E., ONCLIN, K., AEBERLÉ, C., BRUNET, S. et POULET, H. (2005). Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*. 64 (1), pp. 61-74. DOI [10.1016/j.theriogenology.2004.11.016](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.016).

ROOT KUSTRITZ, M.V. (2005). Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. *Theriogenology*. 64 (3), pp. 755-765. DOI [10.1016/j.theriogenology.2005.05.024](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.024).

ROTA, A., DOGLIERO, A., BIOSA, T., MESSINA, M., PREGEL, P. et MASOERO, L. (2020). Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 in Breeding Dogs with or Without Vaccination in Northwest Italy. *Animals*. 10 (7), pp. 1116. DOI [10.3390/ani10071116](https://doi.org/10.3390/ani10071116).

ROTA, P. A. et MAES, R. K., 1990. Homology between feline herpesvirus-1 and canine herpesvirus. *Archives of Virology*. 115 (1-2), pp. 139-145. DOI [10.1007/BF01310631](https://doi.org/10.1007/BF01310631).

SALUSTRI, A., CAMAIONI, A., DI GIACOMO, M., FULOP, C. et HASCALL, V. C. (1999). Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Human reproduction update*. 5 (4), pp. 293-301. DOI [10.1093/humupd/5.4.293](https://doi.org/10.1093/humupd/5.4.293).

SCHULZE, C. et BAUMGÄRTNER, W. (1998). Nested polymerase chain reaction and in situ hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. *Veterinary pathology*. 35 (3), pp. 209-217. DOI [10.1177/030098589803500306](https://doi.org/10.1177/030098589803500306).

SCHWERS, A., PASTORET, P.P. et AGUILAR-SETIEN, A. (1980). Fréquence de l'infection par le virus herpétique canin (canine herpesvirus 1) en Belgique. *Ann. Méd. Vét*, **124**, pp. 353-359.

SEMPRINI, A. E, LEVI-SETTI, P. et BOZZO, M. (1992). Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *The Lancet*, **340**, pp. 1317-1319

SEO, I., SEONG, W-W. et LIM, C-H. (1994). Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea. *Korean J Vet Res*. **34** (3), pp. 647-652.

SILVA, L. D., ONCLIN, K., SNAPS, F. et VERSTEGEN, J. (1995). Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology*. 43 (3), pp. 615-623. DOI [10.1016/0093-691x\(94\)00067-5](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)00067-5).

SOARES, J. M., AVELAR, G.F. et FRANÇA, L.R. (2009). The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (*Canis familiaris*). *Journal of Anatomy*. 215 (4), pp. 462-471. DOI [10.1111/j.1469-7580.2009.01122.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01122.x).

SOKOLOWSKI, J. H. (1971). The effects of ovariectomy on pregnancy maintenance in the bitch. *Laboratory animal science*, **21** (5), pp. 696-699.

SPECK, S.H. et GANEM, D. (2010). Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses. *Cell Host & Microbe*. 8 (1), pp. 100-115. DOI [10.1016/j.chom.2010.06.014](https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.014).

SPERTUS, C.B., MOHAMMED, H.O. et LEDBETTER, E.C. (2016). Effects of topical ocular application of 1% trifluridine ophthalmic solution in dogs with experimentally induced recurrent ocular canine herpesvirus-1 infection. *American Journal of Veterinary Research*. 77 (10), pp. 1140-1147. DOI [10.2460/ajvr.77.10.1140](https://doi.org/10.2460/ajvr.77.10.1140).

STEWART, S.E., DAVID-FERREIRA, J., LOVELACE, E., LANDON, J. et STOCK, N. (1965). HERPES-LIKE VIRUS ISOLATED FROM NEONATAL AND FETAL DOGS. *Science (New York, N.Y.)*, **148** (3675), pp. 1341-1343.

STRANDBERG, J D et CARMICHAEL, L E. (1965). Electron microscopy of a canine herpesvirus. *Journal of Bacteriology*. 90 (6), pp. 1790-1792. DOI [10.1128/jb.90.6.1790-1792.1965](https://doi.org/10.1128/jb.90.6.1790-1792.1965).

STRÖM HOLST, B., HAGBERG GUSTAVSSON, M., GRAPPERON-MATHIS, M., LILLIEHÖÖK, I., JOHANNISSON, A., ISAKSSON, M., LINDHE, A. et AXNÉR, E. (2012). Canine Herpesvirus During Pregnancy and Non-Pregnant Luteal Phase. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 (S6) pp. 362-365. DOI [10.1111/rda.12099](https://doi.org/10.1111/rda.12099).

TAKUMI, A., KUSANAGI, K-I., TUCHIYA, K., XUAN, X., AZETAKA, M. et TAKAHASHI, E. (1990). Serodiagnosis of canine herpesvirus infection - Development of an enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. *The Japanese Journal of Veterinary Science*. 52 (2), pp. 241-250. DOI [10.1292/jvms1939.52.241](https://doi.org/10.1292/jvms1939.52.241).

TANAKA, T., NAKATANI, S., XUAN, X., KUMURA, H., IGARASHI, I. et SHIMAZAKI, K-I. (2003). Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. *Antiviral Research*. 60 (3), pp. 193-199. DOI [10.1016/S0166-3542\(03\)00157-8](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(03)00157-8).

TAVERNE, M. et NOAKES, D.E. Pregnancy and Its Diagnosis. In : NOAKES, D.E., PARKINSON, T.J. et ENGLAND, G.C.W. (2019). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th Edition. St. Louis : W.B. Elsevier. pp. 78-114.

THIRY, J., KEUSER, V., SCHYNTS, F., CHARTIER, C., TEMPESTA, M., ESPEJO-SERRANO, J. et SAEGERMAN, C. (2006). Évaluation de la séroprévalence de l'infection à l'herpesvirus caprin 1 dans le Sud-Ouest de l'Europe. 49, p. 55-58

THOMASSEN, R. et FARSTAD, W. 2009. Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology*. 71 (1), pp. 190-199. DOI [10.1016/j.theriogenology.2008.09.007](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.007).

TRUYEN, U., MÜLLER, T., HEIDRICH, R., TACKMANN, K. et CARMICHAEL, L. E.. (1998). Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiology and Infection*. 121 (2), pp. 433-440. DOI [10.1017/S0950268898001319](https://doi.org/10.1017/S0950268898001319).

TSUTSUI, T. (1975). Studies on the reproduction in the dog. V. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. *The Japanese journal of animal reproduction*, 21 (2), pp. 70-75.

TSUTSUI, T., SHIMIZU, T., OHARA, N., SHIBA, Y., HIRONAKA, T., ORIMA, H. et OGASA, A. (1989). Relationship between the Number of Sperms and the Rate of Implantation in Bitches Inseminated into Unilateral Uterine Horn. *The Japanese Journal of Veterinary Science*. 51 (2), pp. 257-263. DOI [10.1292/jvms1939.51.257](https://doi.org/10.1292/jvms1939.51.257).

TULSIANI, D.R.P., ABOU-HAILA, A., LOESER, C.R. et PEREIRA, B.M.J. (1998). The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *Experimental Cell Research*. 240 (2), pp. 151-164. DOI [10.1006/excr.1998.3943](https://doi.org/10.1006/excr.1998.3943).

VAISSAIRE, J.P. Activité sexuelle de la femelle. In : VAISSAIRE, J.P. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire (1977). Paris. Maloine SA Editeur. pp. 299-303.

VAN GUCHT, S., NAUWYNCK H. et PENZAERT, M. (2001). Prevalentie van het caniene herpesvirus in kennels en het mogelijk verband met vruchtbaarheidsproblemen en neonatale sterfte. *VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT*. **70**, 204–211.

VEETIL, M.V., KRISHNA, G., et PILLAI, V.S. Viral and Host Cellular Factors Used by Neurotropic Viruses. In: KUMAR, S. (2021). *The Molecular Immunology of Neurological Diseases*. Elsevier. pp. 75-83.

VERSTEGEN-ONCLIN, K. et VERSTEGEN, J. (2008). Endocrinology of pregnancy in the dog: A review. *Theriogenology*. 70 (3), pp. 291-299. DOI [10.1016/j.theriogenology.2008.04.038](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.038).

VOLKMANN, D.H. (2006). The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentrations. *Theriogenology*. 66 (6-7), pp. 1583-1586. DOI [10.1016/j.theriogenology.2006.01.024](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.024).

WANG, K., GOODMAN, K.N., LI, D.Y., RAFFELD, M., CHAVEZ, M. et COHEN, J.I. (2016). A Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) gD Mutant Impaired for Neural Tropism Is Superior to an HSV-2 gD Subunit Vaccine To Protect Animals from Challenge with HSV-2. LONGNECKER, R. M. (éd.), *Journal of Virology*. 90 (1), pp. 562-574. DOI [10.1128/JVI.01845-15](https://doi.org/10.1128/JVI.01845-15).

WANG, L-C., KUO, Y-T., CHUEH, L-L., HUANG, D. et LIN, J-H. (2017). The detection and differentiation of canine respiratory pathogens using oligonucleotide microarrays. *Journal of Virological Methods*. 243, pp. 131-137. DOI [10.1016/j.jviromet.2017.02.004](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.004).

WATT, D. A., SPRADBROW, P. B. et LAMBERTH, J. L. (1974). Neo-natal mortality of puppies in Queensland caused by canine herpesvirus infection. *Australian veterinary journal*. 50 (3), pp. 120-122. DOI [10.1111/j.1751-0813.1974.tb05274.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1974.tb05274.x).

WATTS, D.E. et BENSON, A-M. (2016). Prevalence of antibodies for selected canine pathogens among wolves (*Canis lupus*) from the Alaska Peninsula, Usa. *Journal of Wildlife Diseases*. 52 (3), pp. 506-515. DOI [10.7589/2015-06-140](https://doi.org/10.7589/2015-06-140).

WESTERMEYER, H.D., THOMASY, S.M., KADO-FONG, H. et MAGGS, D.J. (2009). Assessment of viremia associated with experimental primary feline herpesvirus infection or presumed herpetic recrudescence in cats. *American journal of veterinary research*. 70 (1), pp. 99-104. DOI [10.2460/ajvr.70.1.99](https://doi.org/10.2460/ajvr.70.1.99).

WHEAT, W., CHOW, L., KUZMIK, A., SOONTARARAK, S., KURIHARA, J., LAPPIN, M. et DOW, S. (2019). Local immune and microbiological responses to mucosal administration of a Liposome-TLR agonist immunotherapeutic in dogs. *BMC Veterinary Research*. 15 (1), pp. 330. DOI [10.1186/s12917-019-2073-8](https://doi.org/10.1186/s12917-019-2073-8).

WRIGHT, N. G., CORNWELL, H. J., THOMPSON, H. et STEWART, M. (1970). Canine herpesvirus respiratory infection. *The Veterinary record*, **87** (4), pp. 108-109.

XUAN, X., HORIMOTO, T., LIMCUMPAO, J. A., TOHYA, Y., TAKAHASHI, E. et MIKAMI, T. (1992). Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection. *Archives of Virology*. 122 (3-4), pp. 359-365. DOI [10.1007/BF01317197](https://doi.org/10.1007/BF01317197).

XUAN, X., KOJIMA, A., MURATA, T., MIKAMI, T. et OTSUKA, H. (1997). Analysis of canine herpesvirus gB, gC and gD expressed by a recombinant vaccinia virus. *Archives of Virology*. 142 (5), pp. 1003-1010. DOI [10.1007/s007050050135](https://doi.org/10.1007/s007050050135).

YANG, X., XIAO, C., LIU, F., JIAN, F., YANG, L., NIE, H. et WU, J. (2018). Evaluation of three-dimensional superimposition technique on parietal bone of the puberty beagle dogs. *Oral diseases*. 24 (8), pp. 1532-1537. DOI [10.1111/odi.12929](https://doi.org/10.1111/odi.12929).

YEŞİLBAĞ, K., YALÇIN, E., TUNCER, P. et YILMAZ, Z. (2012). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Research in Veterinary Science*. 92 (1), pp. 36-39. DOI [10.1016/j.rvsc.2010.10.016](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.016).

ZHAO, M. et DEAN, J. (2002). The zona pellucida in folliculogenesis, fertilization and early development. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 3 (1), pp. 19-26. DOI [10.1023/a:1012744617241](https://doi.org/10.1023/a:1012744617241).

ANNEXES

Annexe 1: Lettre de consentement éclairé à destination des propriétaires pour réalisation de prélèvements sur une chienne



Service Pathologie de la Reproduction
Prélèvements thèse sur L'HERPESVIROSE CANINE

FICHE CHIENNE

Je, soussigné(e) (NOM & Prénom)
demeurant à (adresse et localité).....
reconnait avoir été informé(e) par le Dr Djemil BENCHARIF de l'intégralité des procédures mises en jeu lors de l'étude clinique visant à rechercher le virus de l'herpesvirose canine dans le sang et les cellules vaginales de ma chienne. Pour cette étude, j'accepte librement que soit inclus l'animal dont je suis le propriétaire* ou le détenteur* :
Nom :
Sexe :
Type et n° d'identification :
Espèce et race :
Date de naissance :

J'atteste avoir compris les bénéfices attendus et les risques potentiels (cf verso de cette page) liés à la mise en œuvre de cette étude et qui m'ont été clairement énoncés par le Dr Djemil BENCHARIF.

J'atteste être conscient que dans le cadre de la pratique vétérinaire, une prise de sang et un frottis vaginal peuvent être nécessaires afin de rechercher l'herpèsvirus canin ou des traces de son passage.

J'ai noté que la participation à l'étude clinique n'occasionne aucun frais supplémentaire à ma charge et qu'elle ne s'accompagne pas non plus d'une rémunération associée.

J'ai été prévenu(e) que j'ai le droit à tout moment et pour quelque raison que ce soit de retirer mon animal de l'étude.

J'autorise les équipes de recherche d'Oniris et/ou leurs partenaires à utiliser les données et les prélèvements de mon animal de manière anonyme dans le but d'améliorer l'état des connaissances scientifiques et techniques sur le sujet. Je consens cependant à la levée de l'anonymat si celle-ci est demandée par les autorités publiques.

J'accepte la cession gratuite des prélèvements effectués sur mon animal à ONIRIS.

Je déclare avoir eu de la part du Dr Djemil BENCHARIF toutes les réponses à mes questions.

Fait àle202..
Signature du propriétaire* ou du détenteur* de l'animal

* rayer la mention inutile

Etude clinique : « Recherche par PCR quantitative en temps réel de l'herpesvirus canin dans différents prélèvements biologiques chez des chiens mâles et femelles ; comparaison de l'efficacité de différents tests et étude du risque de transmission vénérienne ».

Investigateur Principal : Dr Djemil BENCHARIF

Bénéfices attendus	Contraintes éventuelles
<ul style="list-style-type: none">- Détection d'un portage éventuel du virus de l'herpesvirose canine chez votre animal avec détermination potentielle de la localisation biologique de ce portage- Les informations sur le statut de votre animal concernant l'herpervirus canin vous permettent d'adapter les mesures prophylactiques à prendre lors de la mise à la reproduction- Contribution à l'approfondissement des connaissances sur l'herpesvirus canin et son portage chez les chiens	<ul style="list-style-type: none">- Inconfort passager éventuel lors de la prise de sang- Inconfort éventuel lors du passage de la cytobrosse au niveau du vagin de votre chienne

Fait à Oniris, le 202..

Signature de l'investigateur principal

Signature du propriétaire* ou du détenteur* de l'animal

* rayer la mention inutile

Annexe 2 : Lettre de consentement éclairé à destination des propriétaires pour réalisation de
prélèvements sur un chien



Service Pathologie de la Reproduction
Prélèvements thèses sur L'HERPESVIROSE CANINE

FICHE CHIEN

Je, soussigné(e) (NOM & Prénom)
demeurant à (adresse et localité).....

reconnait avoir été informé(e) par le Dr Djemil BENCHARIF de l'intégralité des procédures mises en jeu lors de l'étude clinique visant à rechercher le virus de l'herpesvirose canine dans le sang, le sperme et les cellules préputiales de mon chien. Pour cette étude, j'accepte librement que soit inclus l'animal dont je suis le propriétaire* ou le détenteur* :

Nom :

Sexe :

Type et n° d'identification :

Espèce et race :

Date de naissance :

J'atteste avoir compris les bénéfices attendus et les risques potentiels (cf verso de cette page) liés à la mise en œuvre de cette étude et qui m'ont été clairement énoncés par le Dr Djemil BENCHARIF.

J'atteste être conscient que dans le cadre de la pratique vétérinaire, une prise de sang, un frottis préputial et un prélèvement de spermes peuvent être nécessaires afin de rechercher l'herpèsvirus canin ou des traces de son passage.

J'ai noté que la participation à l'étude clinique n'occasionne aucun frais supplémentaire à ma charge et qu'elle ne s'accompagne pas non plus d'une rémunération associée.

J'ai été prévenu(e) que j'ai le droit à tout moment et pour quelque raison que ce soit de retirer mon animal de l'étude.

J'autorise les équipes de recherche d'Oniris et/ou leurs partenaires à utiliser les données et les prélèvements de mon animal de manière anonyme dans le but d'améliorer l'état des connaissances scientifiques et techniques sur le sujet. Je consens cependant à la levée de l'anonymat si celle-ci est demandée par les autorités publiques.

J'accepte la cession gracieuse des prélèvements effectués sur mon animal à ONIRIS.

Je déclare avoir eu de la part du Dr Djemil BENCHARIF toutes les réponses à mes questions.

Fait àle202..
Signature du propriétaire* ou du détenteur* de
l'animal

* rayer la mention inutile

Etude clinique : « Recherche par PCR quantitative en temps réel de l'herpesvirus canin dans différents prélèvements biologiques chez des chiens mâles et femelles ; comparaison de l'efficacité de différents tests et étude du risque de transmission vénérienne ».

Investigateur Principal : Dr Djemil BENCHARIF

Bénéfices attendus	Contraintes éventuelles
<ul style="list-style-type: none">- Détection d'un portage éventuel du virus de l'herpesvirose canine chez votre animal avec détermination potentielle de la localisation biologique de ce portage- Les informations sur le statut de votre animal concernant l'herpesvirus canin vous permettent d'adapter les mesures prophylactiques à prendre lors de la mise à la reproduction- Contribution à l'approfondissement des connaissances sur l'herpesvirus canin et son portage chez les chiens	<ul style="list-style-type: none">- Inconfort passager éventuel lors de la prise de sang- Inconfort éventuel lors du prélèvement de sperme- Inconfort éventuel lors du passage de la cytobrosse au niveau du prépuce de votre chien

Fait à Oniris, le 202...

Signature de l'investigateur principal

Signature du propriétaire* ou du détenteur* de l'animal

* rayer la mention inutile

Protocole de séparation des phases liquidienne et cellulaire de sperme de chien

- Régler la centrifugeuse sur PR 62 modifié : 4°C à 4000 g pendant 10 minutes.
- Lancer la centrifugeuse à vide après avoir fixé le rotor Eppendorf 1,5 ml, pour qu'elle refroidisse avant utilisation.
- Décongeler le sperme sur glace puis 4 à 5 minutes sur portoir (échantillons de sperme à récupérer à – 80° C).
- Bien homogénéiser le sperme (vortexer modérément).
- Préparer des tubes pour aliquoter le sperme (si grande quantité de sperme) à remettre à – 80° C.
- Préparer des tubes de centrifugation (tubes Eppendorf de 0,2 ml avec bouchon) et déposer au minimum 15 µL de sperme (voir plus).
- Centrifuger à 4° C à 4000*g pendant 10 minutes (ne pas oublier les adaptateurs des tubes pour la centrifugeuse).
- **Attention à éviter les secousses et/ou chocs lors du retrait des tubes et de leurs manipulations.**
- Laisser la centrifugeuse ouverte pour éviter toute condensation dans la machine.
- Retirer délicatement le bouchon et récupérer le plasma séminal (surnageant) avec une pipette de 10 µL (cônes de 0,1 µL à 10 µL de référence 44). Réaliser cette étape en plusieurs fois.
- Laisser le culot recouvert par du surnageant pour éviter de resuspendre les cellules présentes dans le culot.
- Déposer le plasma séminal dans des Eppendorf de 0,2 mL (déposés sur des tubes Eppendorf ouverts et sans bouchons de 0,5 mL).
- Conserver le liquide spermatique et le culot cellulaire – 20°C et/ ou – 80°C.

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN sur écouvillons vaginaux et préputiaux

Extraction d'ADN TOTAL à partir d'ECOUVILLONS VAGINAUX ET PREPUTIAUX

Objectif :

Obtenir de l'ADN génomique de chien et éventuellement de CHV latent (ou en multiplication), sur écouvillons vaginaux et préputiaux.

Consommables, matériel :

- Kit « **Genomic DNA NucleoSpin Tissue** » Macherey-Nagel Référence : **740 952.50 (50 extractions)**
- 2 bains-Marie à **56 et 70°C** Résolubiliser Protéinase K ; aliquoter par 180 µL en Eppendorf 0,5 ml à 20°C
- 1 centrifugeuse 11 000g Ethanol absolu (48 ml) pour reconstituer B5

Mode opératoire

À réaliser dans la « pièce d'extraction IECM » :

- Ecouvillon dans tube de prélèvement (> 2 mL); ajouter **400-600 uL (selon tube)** de **PBS** et **25 µL** de **Protéinase K**.
Vortexer vigoureusement 2 X 5 secondes et incubé **10 minutes** à **56 °C**.
Brève centrifugation 4 000 g, 30 s à 1 min
- Transférer l'écouvillon (pince stérile) et la solution sur la colonne de filtration (anneau rose)
Tube collecteur 2 ml à bouchon - Couper la tige de l'écouvillon.
Centrifuger 1 minute à 11 000 g ; **jeter la colonne**.
- Ajouter **600 µL** de tampon **B3**
Vortex vigoureux, 20 secondes. Centrifuger si besoin
Incuber 5 minutes à TA
Lyser et digérer au Bain-Marie **10 min** à **70°C**
- Ajouter **600 µL** d'**Ethanol** 96-100% (absolu) - Vortexer **vigoureusement** 20 secondes
- **Charger 600 µL de liquide sur colonne Si** (anneau vert 600 µL), placée sur tube collecteur sans bouchon.
Ne pas toucher la membrane de silice avec le cône de la pipette
Centrifuger **1 min** à **11 000 g**. Jeter le tube collecteur ; déposer colonne sur tube collecteur neuf et refaire 2 fois.
- Lavage 1 - ajouter sur la colonne **500 µL** de tampon **BW**. Centrifuger **1 min** à **11000 g**
Jeter le tube collecteur et remettre la colonne sur un tube collecteur propre
- Lavage 2 - ajouter **600 µL** de tampon **B5**. Centrifuger **1 min** à **11 000 g**.
Jeter le tube collecteur et placer la colonne sur un tube collecteur propre
- **Centrifuger de nouveau, 1 min** à **11 000 g** (éliminer totalement éthanol). Vérifier que colonne **bien sèche**
- **Elution** - Placer la colonne sur un **Eppendorf 1,5 ml** annoté sur bouchon ; déposer **50 µL de tampon BE**
Incuber 1 min à température ambiante (rendement) - Centrifuger **1 minute** à **11000 g**
Repasser les **50 µL** de tampon **BE** sur la colonne - Centrifuger **1 minute** à **11000 g**
Jeter la colonne. Bien fermer l'Eppendorf.

NB Dosage au Nanodrop (PFBM) : sacrifier 2 microlitres avant 4°C ou -20°C (conservation long terme)
Attention aux risques de contaminations (contact cônes, aérosols ...)

Attention aux compatibilités cônes / pipettes – Rdt environ 100-200 ng/µl

Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN sur sang total

Extraction d'ADN TOTAL à partir de Sang de Chien

Objectif :

Obtenir de l'ADN génomique de Chien et éventuellement de CHV latent (ou en multiplication)

Consommables, matériel :

- Kit « **Genomic DNA NucleoSpin Tissue** » Macherey-Nagel Référence : **740 952.50 (50 extractions)**
- 1 bain-marie à **70°C** Resolubiliser ProtéinaseK et aliquoter par 150 µL en Eppendorf 0,5 ml
- 1 centrifugeuse 11 000g Ethanol absolu (48 ml) pour reconstituer B5

Mode opératoire

À réaliser dans la « pièce d'extraction IECM » :

- Déposer **200 µL de Sang prélevé sur EDTA** (frais ou décongelé) dans un tube ppp 2ml
- Ajouter **25 µL de protéinase K et 200 µL de tampon B3**
- Mélanger au Vortex vif, 20 secondes. Centrifuger si besoin - Incuber 5 min à TA
- Lyser et digérer au bain-marie 10 min à 70°C
- Centrifuger brièvement, puis ajouter **210 µL d'Ethanol absolu**
- Mélanger au Vortex **vigoureusement** 20 secondes
- **Transférer tout le liquide sur colonne** (max. 700 µL), placée sur un tube collecteur.
- Ne pas toucher la membrane de silice avec le cône de la pipette
- Centrifuger **1 min à 11 000 g**. Jeter le tube collecteur et déposer la colonne sur un tube collecteur propre
- Lavage 1 : ajouter sur la colonne **500 µL de tampon BW**. Centrifuger **1 min à 11000 g**
- Jeter le tube collecteur et remettre la colonne sur un tube collecteur propre
- Lavage 2 : ajouter **600 µL de tampon B5**. Centrifuger **1 min à 11 000 g**.
Jeter le tube collecteur et placer la colonne sur un tube collecteur propre
- **Centrifuger de nouveau, 1 min à 11 000 g** pour éliminer totalement l'éthanol. Vérifier que la colonne **est bien sèche**
- Placer la colonne sur un **tube « Eppendorf » 1,5 ml, annoté sur bouchon** et déposer **100 µL de tampon BE**.
- **Elution** : Incuber 1 min à température ambiante (améliore le rendement) - Centrifuger **1 minute à 11000 g**
Jeter la colonne Bien fermer l'Eppendorf 1,5 ml.

NB Dosage au Nanodrop (PFBM) : sacrifier 2 microlitres avant 4°C ou -20°C (conservation long terme)
Attention aux risques de contaminations (contact cônes, aérosols ...)
Attention aux compatibilités cônes / pipettes

Annexe 6 : Protocole utilisé pour l'extraction d'ADN du culot cellulaire spermatique et des organes prélevés

Extraction d'ADN TOTAL à partir de culots de cellules

Objectif :

Obtenir de l'ADN génomique de Chien et éventuellement de CHV latent (ou en multiplication)

Consommables, matériel :

- Kit « **Genomic DNA NucleoSpin Tissue** » Macherey-Nagel Référence : **740 952.50 (50 extractions)**
- 1 bain-marie à **70°C** Resolubiliser ProtéinaseK et aliquoter par 150 µL en Eppendorf 0,5 ml
- 1 centrifugeuse 11 000g Éthanol absolu (48 ml) pour reconstituer B5

Mode opératoire

À réaliser dans la « pièce d'extraction IECM » :

- Déposer 200 µL de tampon de lyse T1 sur culot cellulaire (frais ou décongelé > ou = à 1,5ml)
- Mélanger au vortex vigoureusement 20 secondes
- Ajouter **25 µL de protéinase K** et **200 µL de tampon B3**
- Mélanger au Vortex vif, 20 secondes. Centrifuger si besoin - Incuber 5 min à TA
- Lyser et digérer au bain-marie 10 min à 70°C
- Centrifuger brièvement, puis ajouter **210 µL d'Éthanol absolu**
- Mélanger au Vortex **vigoureusement** 20 secondes
- **Transférer tout le liquide sur colonne** (max. 700 µL), placée sur un tube collecteur.
- Ne pas toucher la membrane de silice avec le cône de la pipette
- Centrifuger **1 min à 11 000 g**. Jeter le tube collecteur et déposer la colonne sur un tube collecteur propre
- Lavage 1 : ajouter sur la colonne **500 µL de tampon BW**. Centrifuger **1 min à 11000 g**
- Jeter le tube collecteur et remettre la colonne sur un tube collecteur propre
- Lavage 2 : ajouter **600 µL de tampon B5**. Centrifuger **1 min à 11 000 g**.
Jeter le tube collecteur et placer la colonne sur un tube collecteur propre
- **Centrifuger de nouveau, 1 min à 11 000 g** pour éliminer totalement l'éthanol. Vérifier que la colonne **est bien sèche**
- Placer la colonne sur un **tube « Eppendorf » 1,5 ml, annoté sur bouchon** et déposer **100 µL de tampon BE**.
- **Elution** : Incuber 1 min à température ambiante (améliore le rendement) - Centrifuger **1 minute à 11000 g**
Jeter la colonne Bien fermer l'Eppendorf 1,5 ml.

NB Dosage au Nanodrop (PFBM) : sacrifier 2 microlitres avant 4°C ou -20°C (conservation long terme)
Attention aux risques de contaminations (contact cônes, aérosols ...)
Attention aux compatibilités cônes / pipettes – Rdt environ 100-200 ng/µl

Annexe 7 : Protocole utilisé pour l'extraction d'ADN viral dans la phase liquidienne spermatique

Extraction d'ADN VIRAL à partir de liquide biologique (sperme chien)

Objectif :

Obtenir de l'ADN de CHV dans la phase liquidienne du sperme de chien, à l'aide du kit MECHEREY-NAGEL « Viral RNA and DNA – NucleoSpin Virus »

Avant de commencer la réaction :

- Vérifier que le tampon VW2 est préparé comme indiqué
- Vérifier que le Carrier ARN est dissout dans l'eau
- Préparer un bain-marie à 70°C

Mode opératoire : à réaliser dans la « pièce d'extraction IECM » :

- Déposer 5 µL de protéinase K dans un tube collecteur de 1,5 mL
 - Ajouter 200 µL du liquide spermatique → cf procédure d'extraction du liquide spermatique
 - Vortexer modérément 10 s
 - Ajouter 200 µL de tampon de lyse VL
 - Vortexer modérément 10 s
 - Centrifuger si besoin à 2000 g, 10 s
 - Ajouter 5,6 µL de solution Carrier ARN
 - Vortexer modérément 5 s
 - Incuber 3 min à température ambiante
 - Centrifuger à 2000 g 1s si besoin
 - Ajouter 200 µL d'éthanol et vortexer 10 s
 - Incuber 5 min à température ambiante
 - Centrifuger brièvement 1s à 2000 g
 - Charger 610 µL de la solution sur une colonne NucleoSpin Virus
 - Centrifuger 3 min à 4000 g
 - Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur et jeter le précédant
 - 1^{er} lavage : Ajouter 400 µL de Tampon VW1 sur la colonne
 - Centrifuger 30 s à 11 000 g
 - Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur et jeter le précédant
 - 2^{ème} lavage : Ajouter 400 µL de Tampon VW2 sur la colonne
 - Centrifuger 30s à 11 000 g
 - Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur et jeter le précédant
 - 3^{ème} lavage : Ajouter 200 µL de Tampon VW2 sur la colonne
 - Centrifuger 5min à 20 000 g
 - Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur et jeter le précédant
 - Incuber 5 min à tube ouvert 5 min à 56°C
 - Ajouter 30 µL d'eau stérilise à 70°C sur la colonne
 - Incuber 3 min à température ambiante
 - Centrifuger 3 min à 20 000 g
- ➔ Récupérer le contenu du tube. Dosage optique à l'aide du Nanodrop. Nb : dosage potentiellement faussé par le « Carrier RNA ».

Annexe 8 : Rapport d'autopsie du chiot mort de la chienne F-070



Autopsie-Service
Site de la Chantrerie – CS 40706
44307 NANTES Cedex 3
Téléphone : 02.40.68.40.29
Mail : autopsie.service@oniris-nantes.fr

DOSSIER N°AS 22-081

VETERINAIRE PATHOLOGISTE : Dre Laetitia Dorso, laetitia.dorso@oniris-nantes.fr

COMPTE-RENDU INTERMEDIAIRE

ACTES REALISES

	Acte réalisé, compte-rendu joint	Acte en attente
Examen macroscopique du cadavre le 01/04/2022	X	
PCR Herpesvirus		X

Date rédaction : 01/04/2022

COMMENTAIRES

L'animal autopsié présente un tableau lésionnel fortement évocateur d'une **herpèsvirose canine** (CaHV-1) caractérisé par :

- une nécrose hépatique multifocale,
- une néphrite interstitielle marquée, subaiguë et à de nombreux foyers hémorragiques,
- un œdème pulmonaire aigu, diffus, marqué,
- et une nécrose splénique multifocale.

La confirmation formelle de ce diagnostic nécessite la mise en évidence du virus par PCR (surcoût de 76€). Si vous souhaitez que cette analyse soit réalisée, merci de nous en informer rapidement.

Pour les autres chiots de la portée, il est vivement conseillé de les mettre sous lampe chauffante en veillant à maintenir un état d'hydratation correct. Pour les portées à venir, il est également conseillé de vacciner les mères.

Le détail des résultats de l'examen nécropsique est présenté dans la suite de ce dossier.

Dre Laetitia Dorso, Dip. ECVF



EXAMEN MACROSCOPIQUE DU CADAVRE

N°AS 22-081

Animal : CHIOT femelle de race Rottweiler, née le 23/03/2022

Date : 01/04/2022

Etat d'embonpoint : 3/9, présence de tissu adipeux en quantité peu abondante, notamment au niveau du tissu conjonctif sous-cutané, des séreuses péritonéales et du mésentère, conformément au jeune âge de l'animal.

Etat de conservation : Excellent.

- Extérieur

Peau, Tissu sous-cutané : Présence d'un œdème modéré du tissu conjonctif sous-cutané.

- Cavités corporelles

Cavité abdominale, Cavité pleurale, Cavité péricardique : Absence de lésion significative.

- Appareil digestif

Cavité buccale, Œsophage : Absence de lésion significative.

Estomac : Présence d'un contenu stomacal peu abondant, essentiellement muqueux. Absence de lésion significative de la muqueuse stomacale.

Intestin grêle, Caecum, Colon, Rectum : Contenu digestif modérément abondant. Absence de lésion significative des muqueuses digestives.

Foie : Présence de foyers beiges bien délimités, parfois coalescents.

Vésicule biliaire : Réplétion modérée.

Pancréas : Absence de lésion significative.

- Appareil urinaire

Rein : Les deux reins présentent la même lésion : le cortex présente de nombreuses hémorragies rénales extensives conférant un aspect « marbré » aux reins, associées à des ponctuations blanchâtres, de disposition radiée à la coupe, intéressant à la fois le cortex et la médulla

Vessie : Absence de lésion significative. Vessie vide.

- Appareil cardio-vasculaire

Cœur, Aorte, Tronc pulmonaire, Veines caves, Veines et artères mésentériques, Vaisseaux ombilicaux : Absence de lésion significative.

- Appareil respiratoire

Larynx, Trachée : Présence de mousse en quantité modérément abondante dans la lumière trachéale.

Poumon : Le parenchyme pulmonaire est de taille augmentée, d'aspect bombé, humide et de couleur rouge, de consistance normale et un abondant fluide mousseux s'écoule à la section des voies respiratoires.

- Organes lymphoïdes

Rate : Présence d'innombrables foyers hémorragiques et blanchâtres de 1 à 2 mm de diamètre, disséminés sur l'ensemble du parenchyme splénique.

Nœuds lymphatiques mésentériques : Absence de lésion significative.



- Appareil génital
Ovaires, Uterus : Absence de lésion significative. Immatures.
- Système nerveux central
Encéphale : Absence de lésion significative.
- Appareil musculo-squelettique
Articulations, Muscles, Tissu osseux : Absence de lésion significative.

CONCLUSION

LESIONS SIGNIFICATIVES

FOIE : NECROSE HEPATIQUE MULTIFOCALE, caractérisée par des foyers beiges bien délimités, parfois coalescents.

REIN : NEPHRITE INTERSTITIELLE MARQUEE, subaiguë, caractérisée par la présence de ponctuations blanchâtres, de disposition radiée à la coupe, intéressant à la fois le cortex et la médulla, associées à de NOMBREUX FOYERS HEMORRAGIQUES conférant un aspect « marbré » aux reins.

POUMON : OEDEME PULMONAIRE DIFFUS, AIGU, MARQUE, caractérisé par un parenchyme pulmonaire de taille augmentée, d'aspect bombé, humide et de couleur rouge, de consistance normale associé à un abondant fluide mousseux s'écoulant à la section des voies respiratoires.

RATE : NECROSE SPLENIQUE MULTIFOCALE, caractérisée par la présence d'innombrables foyers hémorragiques et blanchâtres de 1 à 2 mm de diamètre, disséminés sur l'ensemble du parenchyme splénique.

LESIONS NON SIGNIFICATIVES

Dre Dorso Laëtizia, Dip. ECVP

Annexe 9 : Proposition de protocole de purification de sperme contaminé par des particules virales en position extracellulaire (d'après Semperini et al., 1992)

PROTOCOLE DE PURIFICATION DE SPERME CONTAMINE PAR DES PARTICULES VIRALES EN POSITION EXTRACELLULAIRE (D'APRES SEMPERINO ET AL.,1992)

- Prélever le sperme à l'aide d'un vagin artificielle et de tubes de prélèvements stériles
- Homogénéisation douce du sperme à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes
- Prélèvement de 200 µL de sperme
- Ajout de 200 µL de milieu Menezo B2 (MB2)
- Homogénéisation douce du sperme à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes
- Ajout de 400 µL de MSL (lymphocyte separation medium)
- Centrifugation à température ambiante à 400 g pendant 30 minutes
- Récupération du culot et mise en suspension avec 400 µL de MSL
- Centrifugation à température ambiante à 400 g pendant 10 minutes
- Récupération du culot cellulaire et ajout de 1 mL de MB2
- Incubation 60 min, à 37°C, à 5% de CO₂
- Récupération de 100 µL de la couche supérieure contenant des spermatozoïdes
- Congeler ou inséminer le volume récupérer

Chloë CHARLES

Mise en évidence pour la première fois dans le sperme de chien de l'herpèsvirus canin (CHV) : contribution à l'étude du risque de transmission vénérienne par PCR temps-réel et analyse complémentaire sérologique.

First detection of canine herpesvirus (CHV) in dog semen: a contribution to the study of venereal transmission risk by real-time PCR and complementary serological analysis.

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 19 septembre 2022

RESUME

L'herpèsvirus canin (CHV) est un virus à ADN bicaténaire, responsable, entre autres, de troubles de la reproduction. Les chiens adultes sont le plus souvent asymptomatiques mais les chiots, notamment ceux âgés de moins de 3 semaines, déclarent le plus souvent une atteinte systémique mortelle. Ceci fait du CHV une maladie d'élevage redoutable.

La transmission vénérienne du CHV a été le centre de ce travail. Quatre-vingt-treize animaux reproducteurs ont été prélevés afin de rechercher le virus sur des écouvillons vaginaux (75), préputiaux (18), sur du sperme (18) et du sang total (92) au moyen d'une technique de PCR qui a été mise au point. Cette nouvelle technique de PCR temps-réel EvaGreen®, peu coûteuse, a été comparée à d'autres PCR de référence. Une étude sérologique à faible échelle sur quelques élevages en régions de Loire-Atlantique et en Normandie, a également été effectuée.

La technique de PCR temps-réel EvaGreen® qui a été développée au cours de cette expérimentation, a permis d'obtenir des résultats identiques à ceux obtenus en laboratoire de référence. De plus, et pour la première fois, du CHV a été mis en évidence dans le sperme de 3 chiens sur 18 mâles testés, sans qu'il ne soit détecté au niveau de leur prépuce, ce qui souligne formellement le risque de dissémination du virus via le sperme contaminé. Le CHV a également été mis en évidence dans le vagin de 3 chiennes sur 75 testées. En outre, les résultats sérologiques permettent de confirmer une circulation active du virus au sein des élevages testés puisque près de 82% des 44 chiens testés sont positifs.

La mise en évidence du virus dans le sperme incite à la réalisation d'investigations, afin d'identifier la localisation précise du CHV dans le tractus génital mâle. Cela permettrait l'élaboration de techniques de traitement du sperme en vue d'inséminations artificielles avec des mâles contaminés, à haute valeur génétique, sans contaminer la chienne receveuse.

MOTS CLES :

- | | |
|--|-----------------------------|
| - CHIEN | - MDCK |
| - REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE | - SEROLOGIE |
| - HERPESVIRUS CANIN | - SPERME |
| - HERPESVIROSE | - TRANSMISSION DES MALADIES |
| - CELLULES RENALES CANINES MADIN-DARBY | - REPRODUCTION |

DATE DE SOUTENANCE : le 19 septembre 2022