

ETUDE DE LA PREVALENCE DE LA DIROFILARIOSE CARDIOPULMONAIRE CHEZ LE CHIEN EN NOUVELLE CALEDONIE

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

**VERGNAUD Morgane, Adrienne,
Eugénie**

Directrice de thèse : Mme Emilie BOUHSIRA

JURY

PRESIDENT :
M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Emilie BOUHSIRA
Mme Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **FUSADE-BOYER Maxime**, *Microbiologie et infectiologie*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie pathologique*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

Remerciements

À Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN

Président du jury de thèse

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier,

Zoologie et Parasitologie, Université Paul-Sabatier de Toulouse

Service de Parasitologie et de Mycologie, Institut Fédératif de Biologie, CHU de Toulouse

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Hommages respectueux.

À Madame la Docteure Émilie BOUHSIRA

Directrice de thèse

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie et Maladies Parasitaires

Pour avoir accepté d'être ma Directrice de thèse,

Pour m'avoir encadrée et accompagnée dans ce travail.

Toute ma gratitude.

À Madame la Professeure Séverine Boullier

Assesseur

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter le rôle d'assesseur de cette thèse.

Sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur Domenico OTRANTO

Professeur en Parasitologie Vétérinaire à l'Université de Bari, Italie

Università degli studi di Bari, Aldo Moro, Italie

Et à Madame Lívia Perles

Doctorante en Maladies Parasitaires à l'Université de Bari, Italie

Università degli studi di Bari, Aldo Moro, Italie

*Pour la réalisation des PCR,
Pour leur importante contribution à ce travail de thèse.
Sincères remerciements.*

À l'ensemble des vétérinaires et auxiliaires vétérinaires de Nouvelle-Calédonie ayant participé à mon travail de thèse,

Au Docteur Carole SAMEDI, au Docteur Sophie DINCKEL, à Maureen et à Sterenn du cabinet vétérinaire Mont-Véto, au Mont-Dore,

Au Docteur LESEIGNEUR de la clinique vétérinaire de la Promenade, à Nouméa,

Au Docteur Charlotte RABALLAND de la clinique Nord-Ouest vétérinaire, secrétaire du Groupement Technique Vétérinaire de Nouvelle-Calédonie,

Au Docteur Yann CHARPENTIER de la clinique Nord-Ouest vétérinaire, président du Groupement Technique Vétérinaire de Nouvelle-Calédonie

*Pour avoir eu la patience de réaliser ces prélèvements,
Pour m'avoir guidé dans la réalisation du questionnaire à l'attention de mes confrères et
consœurs calédoniens.
Sans vous ce travail n'aurait pas pu voir le jour.
Toute ma gratitude.*

À mes proches,

Famille et amis

*Pour m'avoir soutenue mais également accompagnée au cours de ce travail.
Merci du fond du cœur.*

Table des matières

Table des annexes	13
Table des figures	14
Table des tableaux	17
Table des abréviations	18
Introduction.....	21
Partie 1 : Étude bibliographique de la dirofilariose cardiopulmonaire canine à <i>Dirofilaria immitis</i> et particularités du territoire calédonien.....	23
I. La Nouvelle-Calédonie : un territoire français au cœur de l’océan Pacifique.....	23
1. Situation géographique et démographique.....	23
2. Biodiversité néo-calédonienne.....	24
3. Situation démographique vétérinaire	25
4. La dirofilariose en Nouvelle-Calédonie.....	25
II. <i>Dirofilaria immitis</i>, filaire du chien.....	25
1. Classification systématique des filaires du chien.....	25
2. Répartition géographique.....	27
a. Répartition géographique de la dirofilariose cardiopulmonaire du chien	27
b. Répartition géographique des cas zoonotiques liés à la dirofilariose cardiopulmonaire	29
3. Morphologie des filaires adultes et des microfilaires	30
a. Morphologie des filaires adultes.....	30
b. Morphologie des stades larvaires.....	31
4. Biologie et cycle évolutif de <i>Dirofilaria immitis</i>	31
a. Hôtes définitifs	31
b. Hôtes intermédiaires	32
c. Développement larvaire.....	33
d. Développement parasitaire chez l’hôte définitif	34
e. Transmission des larves L3 infestantes à l’hôte définitif.....	35
i. Impact de l’humidité.....	36

ii.	Impact de la température	36
III.	Wolbachia pipientis, bactérie symbiotique de D. immitis.....	38
1.	Présentation de Wolbachia pipientis : une alphaprotéobactérie.....	38
2.	Endosymbionte des filaires : Wolbachia.....	39
a.	Localisation	39
b.	Bénéfices réciproques et implications de l'association symbiotique	40
c.	Échappement à la réponse immunitaire	41
IV.	Pouvoir pathogène de Dirofilaria immitis	41
1.	Pathogénie chez le chien.....	41
a.	Microfilaires	41
b.	Larves L1, L2 et L3	42
c.	Adultes vivants	42
d.	Adultes morts.....	45
2.	Contribution de Wolbachia pipientis	45
3.	Potentiel zoonotique de Dirofilaria immitis.....	46
V.	Signes cliniques chez le chien infesté	47
1.	Forme chronique ou "classique"	47
a.	Classe I : Phase de début ou forme frustrée.....	47
b.	Classe II : Phase d'état modérée	48
c.	Classe III : Phase d'état sévère	48
2.	Forme aiguë	49
a.	Syndrome de la veine cave	49
b.	Forme thrombo-embolique	50
i.	Thrombo-embolie pulmonaire	50
ii.	Troubles de la coagulation.....	50
iii.	Thrombo-embolie parasitaire.....	51
3.	Forme occulte	51
4.	Formes atypiques.....	52
a.	Forme oculaire.....	52
b.	Forme neurologique.....	52
c.	Forme cutanée	53

VI. Méthodes de diagnostic expérimental.....	54
1. Éléments d'orientation diagnostique : biologie clinique et imagerie médicale.....	54
a. Biochimie clinique.....	54
b. Radiographie.....	55
c. Examen échographique.....	57
d. Électrocardiogramme.....	57
2. Détection et identification des microfilaires	58
a. Recherche des microfilaires dans le sang	58
i. Examen direct d'une goutte de sang	58
ii. Technique de la goutte épaisse	59
iii. Test utilisant l'hématocrite ou méthode de Schalm et Jain	59
iv. Test de Knott modifié	60
v. Test de filtration sur membrane	61
vi. Intérêts et inconvénients des méthodes directes	61
b. Identification des microfilaires	62
3. Détection d'antigènes de <i>Dirofilaria immitis</i>	63
a. Principe des tests sérologiques	64
i. Méthode ELISA "Sandwich".....	64
ii. Méthode de l'immunochromatographie.....	65
b. Différents tests sérologiques disponibles.....	66
c. Intérêts et inconvénients des tests sérologiques.....	67
i. Avantages	67
ii. Inconvénients.....	67
4. Méthodes de diagnostic moléculaire.....	68
5. Spécificités du diagnostic de la dirofilariose en Nouvelle-Calédonie.....	69
VII. Traitement et prévention	70
1. Prophylaxie de la dirofilariose cardiopulmonaire	70
a. Mesures chimiques de protection contre les moustiques	70
b. Mesures de chimioprévention.....	71
i. Protocoles	71
ii. Spécialités.....	72

iii.	Résistances aux lactones macrocycliques	73
c.	Spécificités de la prophylaxie en Nouvelle-Calédonie	74
i.	Mesures de protection contre les moustiques	74
ii.	Mesures de chimioprévention	74
2.	Traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire.....	75
a.	Traitement médical	76
i.	Thérapie adulticide	76
ii.	Thérapie microfilaricide	80
iii.	Traitements adjuvants	81
•	Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	81
•	Doxycycline.....	82
•	Synthèse des traitements à administrer en cas de complications	83
b.	Traitement chirurgical	84
c.	Spécificités du traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire en Nouvelle-Calédonie.....	86

Partie 2 : Estimation de la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire chez la population canine néo-calédonienne.....89

I. Objectifs de l'étude expérimentale.....89

II. Matériels et méthodes.....89

1.	Recrutement des chiens et modalités de prélèvement.....	89
b.	Modalités de recrutement des chiens	90
c.	Modalités de prélèvement.....	91
d.	Conservation et envoi des échantillons.....	91
2.	Méthodes diagnostiques	91
a.	Test rapide de détection des antigènes parasitaires solubles de <i>D. immitis</i>	91
b.	PCR Duplex quantitative	93
i.	Extraction de l'ADN.....	93
ii.	Détermination de l'ADN Matrice et des amorces.....	94
iii.	Principe de la PCR en temps réel avec la méthode EvaGreen®	94
iv.	Validation des résultats par la présence de témoins positif et négatif.....	95
v.	Protocole de la PCR quantitative ou PCR en temps réel	95

•	Préparation des puits.....	95
•	Amplification lors de la PCR.....	96
•	Précautions lors des manipulations.....	97
III.	Résultats	97
1.	Origines et nombre de chiens inclus dans l'étude.....	98
2.	Analyse de la population canine étudiée.....	99
3.	Résultats du snap-test Dirofilariose canine® de KITVIA et étude statistique	101
a.	Facteur « sexe »	102
b.	Facteur « statut sexuel »	103
c.	Facteur « race ».....	105
d.	Facteur « âge ».....	107
e.	Facteur « médicalisation »	109
f.	Facteur « mode de vie ».....	110
4.	Résultats de la PCR en temps réel	111
5.	Synthèse des résultats	112
IV.	Discussion	113
1.	Population canine et modalités de prélèvement.....	113
a.	Échantillonnage de la population.....	113
i.	Âge des individus prélevés	113
ii.	Aire de prélèvements	114
iii.	Prélèvements en structure vétérinaire	115
iv.	Médicalisation des chiens prélevés.....	116
b.	Modalités de prélèvement.....	116
c.	Transport et conservation des prélèvements sanguins	116
i.	Transport et conservation du sérum.....	116
ii.	Conservation du sang sur EDTA	117
2.	Méthode sérologique de détection des antigènes parasitaires de D. immitis	117
a.	Choix de la méthode	117
b.	Limites de l'interprétation	118
i.	Cycles de congélation-décongélation	118
ii.	Qualité des sérums et du sang total EDTA	118

iii. Existence de faux-négatifs	119
3. Extraction d'ADN.....	119
i. Limites de réalisation.....	119
4. Méthode moléculaire de détection de l'ADN parasite de <i>Dirofilaria immitis</i> : PCR duplex.....	120
a. Choix de la méthode	121
b. Limites d'interprétation	121
i. Qualité des échantillons d'ADN	121
ii. Existence de faux négatifs	121
5. Concordance entre la clinique et la positivité aux tests	122
6. Intérêts et perspectives.....	123
Conclusion	124
Bibliographie	126
Annexes.....	139

Table des annexes

Annexe 1 : Fiche d'information et feuille de consentement éclairé	139
Annexe 2 : Fiche de renseignements et examen clinique de l'animal	141
Annexe 3 : Protocole de gestion d'un animal atteint de dirofilariose cardiopulmonaire (American Heartworm Society 2014)	143
Annexe 4 : Notice d'utilisation du snap-test Dirofilariose canine du laboratoire KITVIA (mars 2020)	143
Annexe 5 : Manuel d'utilisation du NucleoSpin® Tissue pour l'extraction d'ADN génomique et viral à partir d'échantillons sanguins	144
Annexe 6 : Questionnaire à l'attention des vétérinaires calédoniens concernant leurs habitudes vis-à-vis du diagnostic, de la prévention et du traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire (via Google Form).....	145
Annexe 7 : Résultats du questionnaire à l'attention des vétérinaires calédoniens concernant leurs habitudes vis-à-vis du diagnostic, de la prévention et du traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire (via Google Form)	148
Annexe 8 : Anamnèse et commémoratifs des chiens inclus dans l'étude et résultats aux tests PCR et antigéniques.....	152

Table des figures

Figure 1 : Carte de l'archipel de la Nouvelle-Calédonie.....	23
Figure 2 : Répartition géographique des parasites <i>D. repens</i> et <i>D. immitis</i> (Simón et al. 2012)	28
Figure 3 : Répartition géographique des cas humains de dirofilariose sous-cutanée et cardiopulmonaire dans le monde en 2012 (Simón et al. 2012).....	29
Figure 4 : Photographie de trois adultes de <i>Dirofilaria immitis</i> (deux individus mâles en haut de l'image, une femelle en bas)(Miron 2016)	30
Figure 5 : Schéma anatomique d'une microfilaire de <i>Dirofilaria immitis</i> (Ducos De Lahitte 1990)	31
Figure 6 : Moustique femelle du genre <i>Aedes</i> , hôte intermédiaire et vecteur de <i>Dirofilaria immitis</i>	33
Figure 7 : Distribution et migration des larves de <i>Dirofilaria immitis</i> chez des chiens inoculés expérimentalement (Bowman, Atkins 2009)	35
Figure 8 : Cycle de vie parasitaire de <i>Dirofilaria immitis</i> (Anka Friedrich 2013)	37
Figure 9 : Schéma d'un îlot de chaleur (Public Health Note 2018).....	38
Figure 10 : Photographie au microscope électronique à transmission de <i>Wolbachia pipientis</i> au sein d'une cellule d'insecte. Les bactéries <i>Wolbachia</i> sont mises en évidence par la couleur bleue et la lettre "W"	39
Figure 11 : Photographie de <i>Wolbachia pipientis</i> observées au microscope optique et mises en évidence par immunohistochimie au sein des cordes latérales d'un adulte de <i>Dirofilaria immitis</i> . Les « <i>Wolbachia Surface Protein</i> » sont identifiées par la coloration rouge (MSD Manual, Kramer L. 2023)	40
Figure 12 : Schéma de l'évolution des lésions cardiopulmonaires lors d'infestation par <i>D. immitis</i>	44
Figure 13 : Visualisation d'un adulte de <i>Dirofilaria immitis</i> durant une procédure de laminectomie dorsale (au niveau de l'espace intervertébral C3 – C4) chez un chien (Beasley et al. 2021)	53
Figure 14 : Radiographies thoraciques de face et de profil d'un chien atteint d'une dirofilariose cardiopulmonaire modérée. A - Présence de lésions d'opacité alvéolaire. B - image de cœur en "D inversé" caractéristique d'une cardiomégalie droite (American Heartworm Society 2014)	57

Figure 15 : Microfilaire de <i>Dirofilaria immitis</i> observée sur un frottis sanguin au microscope optique (x400), Site internet Orbio.fr	59
Figure 16 : A- Microfilaire de <i>D. immitis</i> observée au microscope dans un échantillon sanguin, colorée au RAL 5-5-5 (objectif x40). B- Microfilaire de <i>D. immitis</i> étendue sur une lame de test de Knott modifié, colorée au bleu de méthylène (objectif x40) (Soares et al. 2022).....	61
Figure 17 : Représentation schématique des zones d'activité phosphatasique acide chez quatre espèces de microfilaires (Schrey, Trautvetter 1998).....	63
Figure 18 : Principe de détection des antigènes parasitaires par la méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Zajac, Conboy 2012).....	65
Figure 19 : Représentation schématique de l'immunochromatographie sur membrane (Béné et al. 2014)	66
Figure 20 : Prévalence des différents effets secondaires rencontrés chez les chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire, traités avec de la mélarsomine par administration par voie intramusculaire issu de la notice technique du Diroban® (ZOETIS).....	78
Figure 21 : Moyenne de délai d'apparition et de durée des effets secondaires consécutifs à l'administration de mélarsomine chez des chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaires, issu de la notice technique du Diroban® (ZOETIS), non commercialisé en France.....	79
Figure 22 : Mortalités comparées selon la cause du décès de l'animal en fonction du stade de la dirofilariose cardiopulmonaire évalué au moment du traitement à la suite de l'administration de mélarsomine chez des chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire, issu de la notice technique du Diroban® (ZOETIS), non commercialisé en France	79
Figure 23 : Périodes de sensibilité aux lactones macrocycliques et à la mélarsomine au cours du développement de <i>Dirofilaria immitis</i> (Merial Limited, Duluth 2008)	81
Figure 24 : Photographies des différentes étapes du traitement chirurgical de la dirofilariose cardiopulmonaire. A- Veinotomie de la veine jugulaire gauche à l'aide d'une aiguille 18G et insertion du guide fil jusqu'à l'artère pulmonaire. B- Remplacement du guide fil par une gaine d'introduction. C- Retrait du guide fil et maintien de la gaine. D- Fixation de la gaine à l'aide d'une suture (Lee, Moon, Hyun 2008).....	85
Figure 25 : Adultes de <i>Dirofilaria immitis</i> retirés chirurgicalement du ventricule droit du cœur d'un chien parasité (Beugnet, Halos, Guillot 2018)	85
Figure 26 : Résumé des résultats obtenus à l'issue du questionnaire à l'attention des vétérinaires calédoniens concernant leurs habitudes en termes de diagnostic, de prévention et de traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire	88

Figure 27 : Photographie de la lecture de résultats de trois tests rapides de diagnostic sérologique.....	92
Figure 28 : Diagramme circulaire représentant l'origine des prélèvements sanguins (N = 79)	98
Figure 29 : Diagrammes circulaires représentant les profils épidémiologiques des chiens prélevés au cours de l'étude (N = 79).....	100
Figure 30 : Carte du territoire néo-calédonien répertoriant l'ensemble des résultats au test sérologique en fonction du lieu de prélèvement	101
Figure 31 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de <i>D. immitis</i> selon le sexe.....	102
Figure 32 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de <i>D. immitis</i> en fonction du statut sexuel	104
Figure 33 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de <i>D. immitis</i> en fonction du sexe et du statut sexuel	104
Figure 34 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de <i>D. immitis</i> selon la race	106
Figure 35 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de <i>D. immitis</i> selon l'âge	107
Figure 36 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de <i>D. immitis</i> selon l'âge	108
Figure 37 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de <i>D. immitis</i> en fonction du statut vis-à-vis de la médicalisation.....	109
Figure 38 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de <i>D. immitis</i> en fonction du mode de vie.....	110
Figure 39 : Courbe de fusion de <i>D. immitis</i> et <i>D. repens</i> . La température de fusion de <i>D. immitis</i> apparait à l'abscisse du maximum de la courbe verte. Dans le cas de <i>D. repens</i> , il s'agit de la courbe noire.....	112
Figure 40 : Carte du territoire néo-calédonien répertoriant le nombre de chiens prélevés en fonction de la zone de prélèvement	115

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques correspondant aux différents découpages de la classification du genre <i>Dirofilaria</i> (Semat 2016).....	27
Tableau 2 : Modifications biochimiques les plus fréquemment rencontrées lors de dirofilariose cardiopulmonaire à <i>Dirofilaria immitis</i> (Bowman, Atkins 2009).....	55
Tableau 3 : Anomalies observées à la radiographie thoracique selon le stade d'évolution de la forme "classique" de la dirofilariose cardiopulmonaire (Bourdoiseau 2000; Castric 2002; Guillot 2008).....	56
Tableau 4 : Morphologie des principales espèces de filaires circulantes chez le chien (Bourdoiseau 2000; Otranto et al. 2013; Magnis et al. 2013; ESCCAP France 2023).....	62
Tableau 5 : Principales spécialités vétérinaires disposant d'une AMM chez le chien avec l'indication « action répulsive contre les moustiques ».....	71
Tableau 6 : Spécialités vétérinaires disposant d'une AMM en France pour la prévention de la dirofilariose à <i>Dirofilaria immitis</i> chez le chien	73
Tableau 7 : Spécialités vétérinaires disposant d'une autorisation administrative d'importation, utilisée pour la prévention de la dirofilariose à <i>D. immitis</i> en Nouvelle-Calédonie.....	75
Tableau 8 : Principaux traitements mis en place lors de complications liées à la dirofilariose cardiopulmonaire chez le chien ou bien à son traitement (Ames, Atkins 2020)	83
Tableau 9 : Taux de réponse et participation des structures vétérinaires contactées.....	98
Tableau 10 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine [®] selon le sexe des individus testés.....	103
Tableau 11 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine [®] selon le statut sexuel des individus testés.....	105
Tableau 12 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine [®] selon la race des individus testés.....	106
Tableau 13 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine [®] selon l'âge des individus testés.....	108
Tableau 14 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine [®] selon le statut médicalisé ou non des individus testés	110

Table des abréviations

AAI : Autorisation Administrative d'Importation

AHS : American Heartworm Society

ALAT : Alanine Aminotransférase

ASAT : Alanine Aspartate Transférase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

APE : Antiparasitaire externe

API : Antiparasitaire interne

BID : *Bis In Die*

BP : Paire de base

CM : Centimètre

COX1 : Cytochrome C Oxydase 1

CRP : Protéine C-Réactive

Ct : *Cycle Threshold* (Cycle seuil)

DEPC : Diéthyl Pyrocarbonate

dNTP : Désoxyribonucléotide Triphosphate

DROM-COM : Départements et Régions d'Outre-Mer et Collectivités d'Outre-Mer

DU : Day Unit

ECG : Électrocardiogramme

EDTA : Acide Éthylène Diamine Tétracétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ENVT : École Nationale Vétérinaire de Toulouse

ESCCAP : European Scientific Counsel Companion Animal Parasites

FDA : Food and Drug Administration

GGT : Gamma-Glutamyltransférase

GTV : Groupement Technique Vétérinaire

IECA : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine

IL : Interleukine

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineux

KG : Kilogramme

Lx : Larve au stade « x »

MDR1 : Multi-Drug Resistance

MG : Milligramme

MM : Millimètre

NC : Nouvelle-Calédonie

NO : Nitric Oxide

PAL : Phosphatase Alcaline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PO : *Per os*

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

RPM : Rotations Par Minute

SDMA : Symmetric Dimethylarginine

SID : *Semel In Die*

TID : *Ter In Die*

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

WSP : Wolbachia Surface Protein

µG : Microgramme

Introduction

La “maladie du ver du cœur” ou dirofilariose cardiopulmonaire, causée par *Dirofilaria immitis*, est une pathologie potentiellement mortelle chez les canidés domestiques et sauvages. Le cycle parasitaire de *D. immitis* fait intervenir des moustiques de la famille des Culicidés jouant à la fois le rôle de vecteurs, par le biais du repas sanguin, et d'hôtes intermédiaires. *Dirofilaria immitis* possède un potentiel zoonotique, ce qui souligne l'importance du dépistage et du traitement de l'infestation parasitaire dans les zones d'endémie. L'ensemble des mesures vise à contrôler le réservoir naturel constitué par les carnivores domestiques.

La dirofilariose cardiopulmonaire existe chez le chien et chez le chat domestique. C'est une maladie d'évolution lente due à la présence de vers adultes dans les artères pulmonaires, et plus rarement le cœur droit, qui vont être responsables d'une insuffisance cardiaque et d'une hypertension pulmonaire. Les vers adultes femelles produisent des microfilaries qui sont libérées dans la circulation sanguine. Au cours d'un repas de sang, le moustique piqueur ingère ces microfilaries. Après une maturation de deux semaines chez le moustique, les larves devenues infestantes seront inoculées à un autre mammifère (chien, chat, Homme, ...).

La dirofilariose est particulièrement présente dans les régions humides et chaudes. En Europe, les pays du pourtour méditerranéen tels que l'Espagne, l'Italie et la Grèce constituent des zones d'enzootie. Les départements côtiers de France métropolitaine ne sont pas épargnés. Cependant, sur le territoire français, les taux de prévalence les plus élevés se retrouvent au sein des départements et régions d'Outre-mer.

La Nouvelle-Calédonie, à l'instar de l'ensemble des DROM-COM français, est une zone d'enzootie de la dirofilariose canine. La prévalence y est estimée à 57% (Beugnet, Bima-Blum, Chardonnet 1993). Les vétérinaires praticiens néo-calédoniens informent et conseillent quasiment quotidiennement les propriétaires de chiens afin de lutter contre l'infestation par les filaires. La prévention consiste en l'administration mensuelle, semestrielle ou annuelle de lactones macrocycliques associée à l'administration régulière de répulsifs (pyréthrinoides). Cependant, malgré la prophylaxie à laquelle les propriétaires de chiens médicalisés sont sensibilisés, le grand nombre de chiens errants, et donc non médicalisés, conduit à une présence toujours importante du parasite au sein de la population canine de l'île.

Ce travail de thèse d'organise en plusieurs parties :

- La première partie, essentiellement bibliographique, rapporte des informations sur la dirofilariose et sur l'agent pathogène responsable, *Dirofilaria immitis* (épidémiologie, biologie, ...) et sur les particularités de la Nouvelle-Calédonie, lorsque les informations

étaient disponibles dans la littérature. Afin de compléter cette partie, nous avons conçu un questionnaire en ligne, en collaboration avec le Groupement Technique Vétérinaire (GTV) de Nouvelle-Calédonie, afin de mieux connaître les habitudes des praticiens en termes de prophylaxie. Ce questionnaire est présenté en paragraphe Partie 1.I.4 et en Annexe 6. Les résultats obtenus via ce questionnaire sont utilisés pour compléter la partie bibliographique de ce travail de thèse, lorsque cela est pertinent.

- La deuxième partie rapporte les objectifs du travail de thèse mené ainsi que les méthodes utilisées pour l'estimation de la prévalence de la dirofilariose. Les protocoles de prélèvements ainsi que ceux des méthodes de diagnostic sérologique et moléculaire sont décrits précisément. Une synthèse et une analyse critique des résultats clôturent la partie.

L'objectif de ce travail de thèse est de (i) présenter une synthèse bibliographique la plus exhaustive possible, en soulignant les particularités de la Nouvelle-Calédonie, lorsque les informations sont disponibles dans la littérature, et (ii) de contribuer à l'estimation de la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire à *D. immitis* au sein de la population canine en Nouvelle-Calédonie à partir d'échantillons de sang périphérique récoltés en cliniques vétérinaires et analysés en sérologie puis PCR quantitative.

Partie 1 : Étude bibliographique de la dirofilariose cardiopulmonaire canine à *Dirofilaria immitis* et particularités du territoire calédonien

I. La Nouvelle-Calédonie : un territoire français au cœur de l’océan Pacifique

1. Situation géographique et démographique



Figure 1 : Carte de l'archipel de la Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie est un archipel situé à l'est de l'Australie, au plein cœur de l'Océan Pacifique, à 16 732 km de la Métropole. L'île principale, appelée la Grande Terre, s'étend sur 500 km de long pour 50 km de large. Elle est bordée par les îles Loyauté à l'Est (Ouvéa, Maré, Lifou), l'île des Pins au Sud et les Bélep au Nord (**Figure 1**). La Nouvelle-Calédonie recense une population pluriethnique de 268.000 habitants. L'archipel, divisé en trois provinces (la Province Sud, la Province Nord et la Province des îles), compte 341 tribus et 33 communes dont la commune de Nouméa, la capitale qui compte près de 100.000 habitants.

L'île connaît un climat tropical tempéré alternant entre deux saisons : la saison sèche et la saison des pluies. L'été austral, aussi appelé "saison des pluies" s'étend de mi-novembre à mi-avril. Les températures maximales observées varient entre 28 et 32°C et l'humidité est largement supérieure à 70%. De nombreux cyclones et dépressions se succèdent à cette période. L'hiver austral ou "saison fraîche", est classiquement notée de mi-mai à mi-septembre et caractérisée par des "coups d'Ouest", vents forts et froids. Les températures sont généralement comprises

entre 15 et 25°C mais des minimales bien en dessous de 15°C sont parfois observées. Le temps d'ensoleillement y est compris entre 2500 et 2800 heures par an.

La Chaîne Centrale, zone montagneuse, marque une différence de climat entre les deux côtes : l'Ouest plutôt sec, région d'élevage et de savanes à niaoulis et la côte Est, luxuriante, arrosée par les alizés (vents d'Est). Les températures annuelles moyennes varient de 22 à 25°C (ISEE, 2011)

2. Biodiversité néo-calédonienne

La Nouvelle-Calédonie fait partie des quatre premiers territoires au monde en termes de biodiversité. Le pourcentage d'espèces endémiques y est très élevé : environ 80% des espèces constituant la flore calédonienne sont endémiques et 80% des 5000 espèces constituant la faune terrestre connue.

Ces particularités climatiques font de la Nouvelle-Calédonie un territoire propice à l'implantation et au développement de nombreuses espèces d'insectes et notamment de moustiques. C'est en 1901 qu'Alphonse Laveran a mis en évidence le premier moustique sur le territoire calédonien. Actuellement, ce sont 21 espèces de moustiques qui sont référencées dont 6 endémiques, réparties en cinq genres différents (*Aedes*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Tripteroides*, *Anopheles* ; les espèces endémiques appartenant aux genres *Culex* et *Tripteroides*). Toutes ne jouent pas le rôle de vecteur d'un agent pathogène. Cependant, compte tenu de l'importance en santé humaine des pathologies associées à la présence des moustiques, les espèces vectrices sont particulièrement étudiées. Ainsi, sur le territoire calédonien, peuvent être retrouvées :

- *Anopheles bancroftii* ;
- *Culex annulirostris* ;
- *Aedes vigilax* ;

Ces trois espèces peuvent être vectrices de la filaire *Wuchereria bancrofti* responsable dans le Pacifique de la filariose lymphatique chez l'Homme.

- *Aedes aegypti*, vecteur du virus du Zika, du chikungunya et de la dengue ;

On retrouve également sur le territoire des espèces considérées comme compétentes pour la transmission de *Dirofilaria immitis*, notamment *Aedes aegypti*, *A. notoscriptus*, *A. vexans*, *C. quinquefasciatus* (CALEDONIA 2022).

3. Situation démographique vétérinaire

D'après le recensement de 2020, soixante-dix vétérinaires exercent sur le territoire calédonien. La moitié d'entre eux exercent à Nouméa. Ils se répartissent sur les 15 structures vétérinaires de la commune. Au total, 50 vétérinaires travaillent dans le Grand Nouméa. Vingt vétérinaires se partagent le reste de l'archipel. On retrouve ainsi un seul praticien sur l'ensemble de la Province des îles Loyauté et un seul sur l'ensemble de la côte Est. Les 18 vétérinaires restants sont répartis dans les villages de la côte Ouest, de Tontouta à Koumac.

4. La dirofilariose en Nouvelle-Calédonie

Peu de données chiffrées sont disponibles dans la littérature sur la prise en charge (prévention et traitement) de la dirofilariose chez le chien en Nouvelle-Calédonie. Afin de tenter de combler ce manque et d'apporter des données actualisées sur ce territoire, nous avons conçu, en collaboration avec le Groupement Technique Vétérinaire de Nouvelle-Calédonie, un questionnaire en ligne qui a été envoyé à l'ensemble des cliniques vétérinaires du territoire. Ce questionnaire soulève les points suivants :

- Outils de diagnostic utilisés
- Protocoles de traitements
- Mesures de prévention

Huit structures vétérinaires ont répondu au questionnaire. Les réponses obtenues ont servi à la rédaction des parties VI.5, VII.1.c et VII.2.c. Le questionnaire complet est présenté en annexe (**Annexe 6**).

II. *Dirofilaria immitis*, filaire du chien

1. Classification systématique des filaires du chien

Parmi les neuf espèces de filaires décrites chez le chien dans le monde, deux présentent un pouvoir pathogène et sont zoonotiques : *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens*. Ces deux espèces sont présentes sur le territoire français métropolitain et en Nouvelle-Calédonie.

Toutes ces espèces se classent dans l'embranchement des Nématodes, vers ronds, filiformes et non segmentés, à sexes séparés, recouverts d'une cuticule et pourvus d'un tube digestif.

Elles appartiennent à la classe des Secernentea et à l'ordre des Spirurida, caractérisée par la présence de nombreuses papilles caudales, d'un système excréteur présentant de nombreux

canaux latéraux, des phasmides (organes sensoriels en position caudale) et d'une bouche non trilabée. Il n'existe pas de bourse copulatrice chez le mâle.

Elles se classent dans la super-famille des Filarioïdea et la famille des Onchocercidae, d'où provient la dénomination de "filaires" dans le langage courant (Bowman, Atkins 2009).

Au sein de leur famille, on distingue deux sous-familles :

- Les *Onchocercinae* :
 - *Acanthocheilonema reconditum*
 - *Acanthocheilonema dracunculoïdes*
 - Le genre *Cercopithifilaria*
 - *Onchocerca lupi*
- Les *Dirofilarinae* avec *Dirofilaria repens* et *Dirofilaria immitis* dont le genre *Dirofilaria* se caractérise par une cuticule dépourvue de protubérance, un œsophage dépourvu de segment glandulaire sacciforme, des spicules très inégaux, des ailes caudales très développées soutenues par des grosses papilles cloacales chez les individus mâles et par l'absence ou le faible développement des ailes latérales (Euzéby 1990).

L'ensemble des caractéristiques permettant la classification des espèces de *Dirofilaria* est résumé dans le tableau ci-dessous (Jacques 2005).

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques correspondant aux différents découpages de la classification du genre *Dirofilaria* (Semat 2016)

Classe : <i>Nématodes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - corps allongé - présence d'une cavité générale - existence d'un tube digestif complet - absence de trompe céphalique - enveloppe pariétale composée de trois couches (dont une cuticule)
Sous-classe : <i>Secernentea</i>	<ul style="list-style-type: none"> - nombreuses papilles caudales - système excrétoire formé de canaux latéraux
Ordre : <i>Spirurida</i>	<ul style="list-style-type: none"> - absence de lèvres (pseudo lèvres possibles) - stoma (aspect de capsule buccale) - papilles labiales absentes - œsophage en deux portions - mâle à extrémité distale spiralée avec deux ailes caudales soutenus par des papilles - deux spicules inégaux
Super-famille : <i>Filarioidea</i>	<ul style="list-style-type: none"> - grande longueur, calibre réduit - apparence filiforme - absence de lèvres, de pseudo lèvres et de capsules buccales - présence de deux cercles de papilles céphaliques plus ou moins développées - mâle avec queue vrillée à spicules inégaux
Famille : <i>Onchocercidae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - adultes de type filaire - extrémité antérieure légèrement dilatée et dépourvue de formation péribuccales chitineuses - vulve antérieure, en arrière de l'anneau nerveux - spicules inégaux et dissemblables - L1 type microfilaire sanguicole ou dermatrope
Sous-famille : <i>Dirofilarinae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - absence de formations sclérifiées saillantes en région céphalique - papilles caudales larges et pédonculées - ailes caudales bien développées - queue courte - microfilaires nues - L3 (infestante) à longue queue
Genre : <i>Dirofilaria</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cuticule avec crêtes longitudinales - mâle à queue spiralée (papilles pré et post cloacales) - femelle à queue courte et arrondie à ouverture vulvaire en arrière de l'œsophage

2. Répartition géographique

a. Répartition géographique de la dirofilariose cardiopulmonaire du chien

Les infections par *Dirofilaria immitis* chez le chien et chez le chat ont été observées partout dans le monde en régions tropicales et tempérées. La prévalence des infestations diffèrent cependant selon les pays, et même parfois, selon les régions. La maladie est particulièrement présente dans les zones humides et chaudes avec un climat subtropical propice au développement des vecteurs telles que l'Asie, l'Australie, l'Amérique du Sud et l'Amérique Centrale où les prévalences peuvent atteindre entre 20 et 60% de la population canine. Actuellement, sa répartition tend à s'étendre aux régions plus tempérées telles que le Canada et le Japon. En Europe, les pays du pourtour méditerranéen sont particulièrement touchés

(Figure 2). L'Italie, l'Espagne, la Grèce mais également la Corse et quelques pays de l'Est de l'Europe constituent à l'heure actuelle des zones d'enzootie de la dirofilariose cardiopulmonaire. À l'heure du réchauffement climatique entraînant une extension de la zone d'activité de nombreux vecteurs de pathogènes, les études épidémiologiques récentes démontrent une augmentation significative de la prévalence des infections autochtones canines à *D. immitis* dans les pays d'Europe centrale et d'Europe du nord (Sassnau et al. 2014).

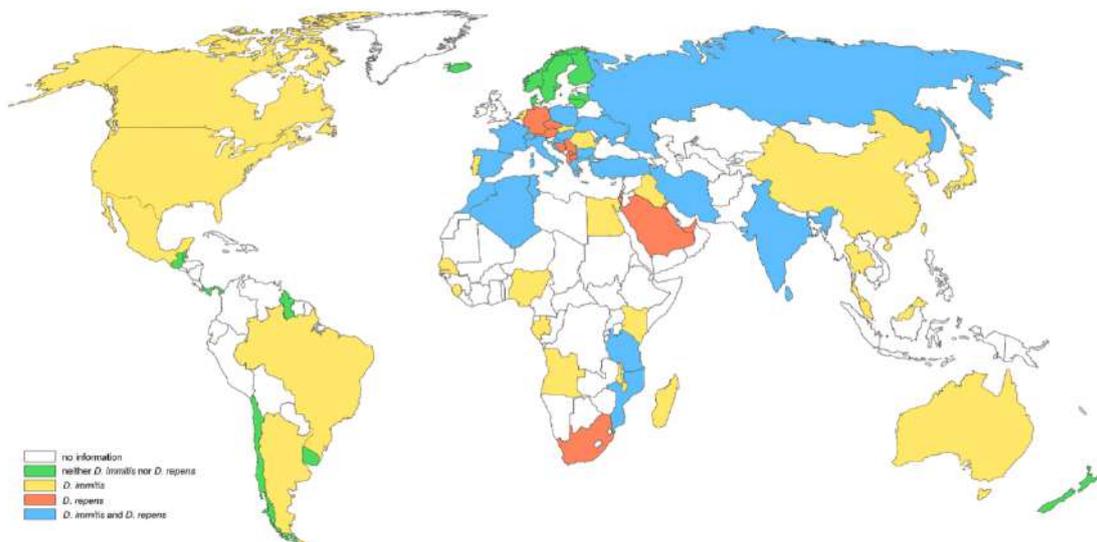


Figure 2 : Répartition géographique des parasites *D. repens* et *D. immitis* (Simón et al. 2012)

Cependant, en France métropolitaine, *D. repens* est largement plus répandue que *D. immitis*. Elle est présente dans environ un tiers des départements français pour une prévalence moyenne chez le chien d'environ 1,3% sur l'ensemble du territoire. La dirofilariose cardiopulmonaire est quant à elle observée majoritairement dans les départements côtiers, en bordure de la mer Méditerranée, dans lesquels une étude de 1986 a démontré une prévalence de la maladie de 0,7% (Bourdoiseau 2000).

En Nouvelle-Calédonie, la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire dans la population canine était estimée à 57% dans une étude de 1993 (Beugnet, Bima-Blum, Chardonnet 1993). Ce taux très élevé est une tendance dans laquelle s'inscrivent les DROM-COM (Polynésie française, Guyane, Antilles et la Réunion) avec notamment une prévalence de la maladie estimée à environ 20% de la population canine réunionnaise (Bourdoiseau, 2000).

Depuis 1993, aucune étude ne s'est intéressée à l'évolution de cette donnée malgré les avancées considérables faites en termes de prévention de la pathologie et la prise de conscience collective de sa gravité.

b. Répartition géographique des cas zoonotiques liés à la dirofilariose cardiopulmonaire

Environ 1782 cas humains de dirofilariose ont été enregistrés dans le monde. Parmi ceux-ci, 372 cas ont été associés à des troubles pulmonaires chez les patients et donc directement imputables à *D. immitis*, et 1410 associés à des troubles cutanés et/ou oculaires, ainsi imputables à *D. repens* (Simón et al. 2012). La répartition actuelle mondiale des cas de dirofilariose humaine ne coïncide pas avec la celle des cas de dirofilariose canine (**Figure 3**). La cause première de cette disparité est le manque de données. En effet, certains pays disposent de données épidémiologiques concernant des cas humains de dirofilariose sous-cutanée alors qu'ils possèdent chez les chiens, uniquement des données concernant la dirofilariose cardiopulmonaire.

Entre 2000 et 2016, seulement 2 cas de dirofilariose cardiopulmonaire ont été recensés en Métropole (Miron 2016) ce qui positionne la France derrière l'Italie en termes de nombre de cas humains en Europe. La répartition géographique des cas est cependant majoritairement localisée au niveau du pourtour méditerranéen, bien que des cas sporadiques dans d'autres régions aient pu être observés.

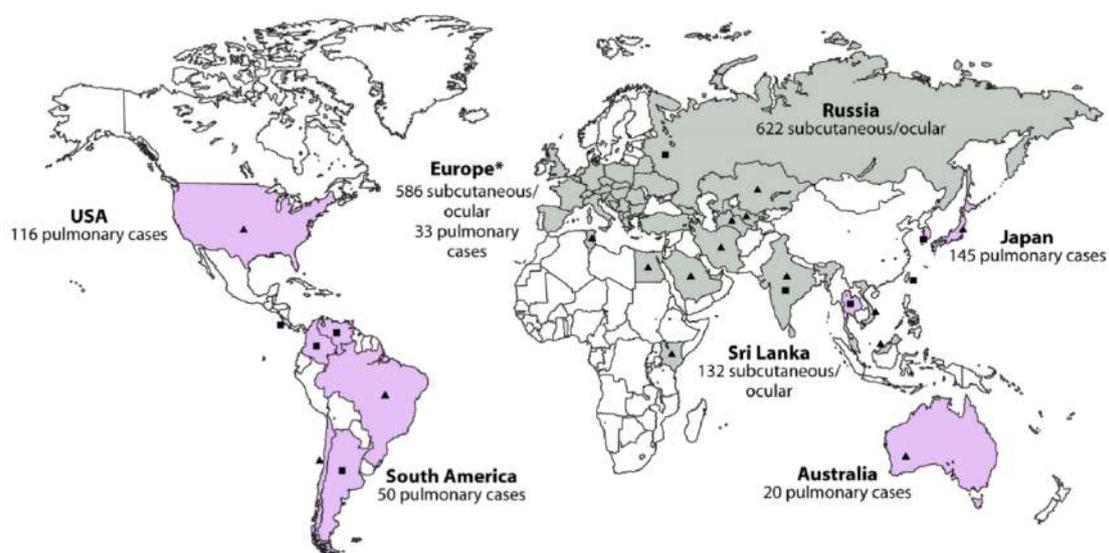


Figure 3 : Répartition géographique des cas humains de dirofilariose sous-cutanée et cardiopulmonaire dans le monde en 2012 (Simón et al. 2012)

Contrairement à l’Ancien Monde, au Japon, en Australie et sur le continent américain, les infections causées par *D. immitis* restent majoritaires (Simón et al. 2012). Il n’existe pas de telles données concernant la Nouvelle-Calédonie. Cependant, la proximité géographique du territoire avec l’Australie et donc la similarité des conditions climatiques qui y règnent, laissent à supposer que les cas de dirofilariose à *D. immitis* représentent la grande majorité des dirofilarioses humaines en Nouvelle-Calédonie.

3. Morphologie des filaires adultes et des microfilaires

a. Morphologie des filaires adultes

Les vers adultes sont de couleur blanchâtre, longs et fins à corps souple. Leur taille diffère selon le sexe de l’individu (**Figure 4**). Les mâles mesurent 12 à 20 cm de long et 0,7 à 0,9 mm de diamètre et sont facilement identifiables par leur extrémité postérieure enroulée en spirale permettant la copulation. Ils présentent des stries et des crêtes sur la face ventrale du dernier fuseau caudal. L’extrémité caudale porte également 4 à 6 paires de papilles pédonculées et 3 à 4 paires de petites papilles coniques. Quant à elles, les femelles mesurent 25 à 31 cm de long sur 1 à 1,3 mm de diamètre (Bowman, Atkins 2009). Leur extrémité caudale se termine par un effilement rectiligne laissant apparaître, en position subventrale, une forme conique papilliforme. Chacun des individus, indépendamment de leur sexe, possède un orifice buccal entouré de 8 papilles médianes et de 2 papilles latérales lui permettant de prélever sur son hôte son repas sanguin (Euzéby 1990). Les filaires de *D. immitis* se nourrissent du plasma sanguin uniquement.

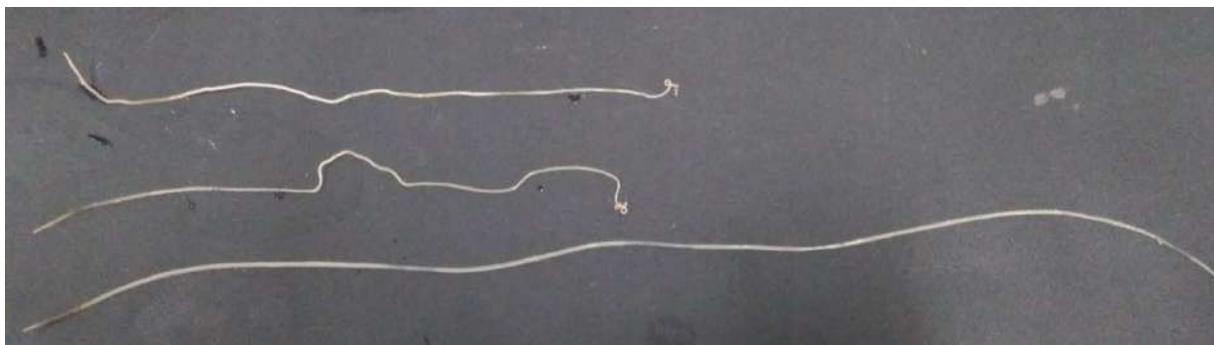


Figure 4 : Photographie de trois adultes de *Dirofilaria immitis* (deux individus mâles en haut de l'image, une femelle en bas)(Miron 2016)

b. Morphologie des stades larvaires

Le premier stade larvaire est appelé “microfilaire” ou larve 1 (L1). Les dimensions maximales et minimales des microfilaries se situent entre 220 à 320 μm de longueur et 5 à 7 μm de largeur (Bourdoiseau 2000). Ce sont des larves à la morphologie allongée et rectiligne. La microfilarie ne présente pas de gaine. Son extrémité antérieure est effilée et l'extrémité postérieure est droite avec une queue pointue (Magnis et al. 2013). Elles sont également recouvertes de stries annulaires à la surface de leur cuticule.

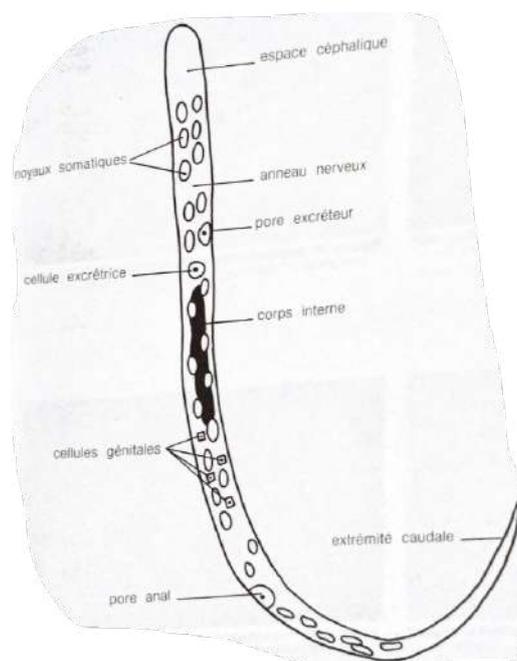


Figure 5 : Schéma anatomique d'une microfilarie de Dirofilaria immitis (Ducos De Lahitte 1990)

Il existe ensuite quatre stades larvaires formés par mues successives, dont les caractéristiques morphologiques sont similaires à celles des microfilaries. Uniquement leur taille diffère selon leur stade de développement :

- L1 et L2 : environ 270 – 365 μm
- L3 : environ 1,5 mm
- L4 : jusqu'à 15 mm
- L5 (forme adulte immature) : entre 20 et 40 mm (Magnis et al. 2013; Euzéby 1990)

4. Biologie et cycle évolutif de *Dirofilaria immitis*

a. Hôtes définitifs

Le chien est l'hôte définitif habituel, mais vingt et une autres espèces de canidés domestiques et sauvages peuvent s'infecter et jouer le rôle de réservoir, tels que le renard, le loup et le coyote. Plus de trente espèces de mammifères ont déjà été diagnostiquées porteuses de *D. immitis* : du mammifère marin aux mustélidés, rongeurs, félidés, ongulés en passant par les singes.

L'Homme et le chat sont considérés comme des hôtes définitifs accidentels. Chez le chat, environ 20% des individus affectés sont microfilarémiques. Les filaires adultes du chat survivent de 2 à 4 ans contrairement au chien chez qui l'espérance de vie des filaires adultes s'étend entre 5 et 7 ans (Beugnet, Halos, Guillot 2018).

Les populations de carnivores domestiques et sauvages constituent des réservoirs de *D. immitis*. Aux Etats-Unis, les populations de coyotes et de renards, deux espèces péri-domestiques, constituent d'excellents réservoirs de cette filaire. *D. immitis* est même considérée comme une cause importante de morbidité et de mortalité au sein de leurs espèces. Sur le territoire métropolitain, le renard roux et le loup pourraient constituer des réservoirs sauvages, cependant des études ont montré des microfilarémies très faibles. En Nouvelle-Calédonie, les chats sauvages (*Felix silvestris*) constituent les seuls représentants de la population des carnivores sauvages. Cependant, similairement au renard roux et au loup, une faible proportion des individus est réellement microfilarémique. Le réservoir des dirofilarioses en Nouvelle-Calédonie est ainsi majoritairement domestique et constitué des populations de chiens errants et/ou non médicalisés (Beugnet, Bima-Blum, Chardonnet 1993; Watier-Grillot et al. 2011).

b. Hôtes intermédiaires

Dirofilaria immitis est vectorisé par des Culicidés, plus communément appelés « moustiques ». Ces insectes jouent le rôle d'hôte intermédiaire permettant également la transmission des parasites d'un hôte définitif à un autre. La transmission des filaires est une conséquence du régime solénophage du vecteur.

Au sein des Culicidés se distinguent deux familles : les Culicines et les Anophélinés, regroupant en France 65 espèces. Les moustiques des genres : *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* sont impliqués dans la transmission de *D. immitis* (ESCCAP France 2023). Actuellement, près de 70 espèces dans le monde sont connues comme permettant le développement larvaire et la transmission du parasite (Bowman, Atkins 2009). Aucun autre arthropode n'a aujourd'hui été démontré comme étant un vecteur de *D. immitis*.

En Nouvelle-Calédonie, une seule espèce d'*Anopheles* est actuellement recensée. Ainsi, les principaux vecteurs de la dirofilariose cardiopulmonaire chez le chien appartiennent aux genres *Aedes* et *Culex* (CALEDONIA 2022).



Figure 6 : Moustique femelle du genre Aedes, hôte intermédiaire et vecteur de Dirofilaria immitis (Beugnet, Halos, Guillot 2018)

Les moustiques vecteurs sont également affectés par la présence de *D. immitis*. Chez *A. aegypti*, une infestation supérieure à 10 larves est mortelle. Ainsi, un repas sanguin sur un hôte définitif dont la microfilarémie est très élevée peut conduire à la mort du vecteur. Le potentiel de transmission des vecteurs est donc liée à la charge parasitaire des hôtes définitifs (Euzéby 1990).

c. Développement larvaire

Le moustique femelle s'infeste en ingérant le sang d'un canidé microfilarémique. Après ingestion, la microfilaire atteint le tube digestif de l'insecte où elle restera durant 24 heures. À la suite de cela, la microfilaire pénètre au sein de la lumière des tubes de Malpighi à sa jonction avec le tube digestif. Elle y débute alors son développement vers le stade L2 autour du 4^{ème} jour. Lorsqu'elle a atteint le stade L3, la larve migre au sein de l'hémocoèle, de l'abdomen du moustique vers sa tête. Puis, elle entre dans la cavité du labium. La durée de maturation des L3 dépend des conditions environnementales extérieures. Une fois cette maturation achevée, les L3 sont infestantes. À la faveur d'un repas de sang sur un hôte définitif, le labium et le proboscis du moustique vecteur se replient et laissent émerger les L3. Elles sont alors déposées au sein de la plaie, accompagnées d'hémolymphe facilitant le mouvement des larves et leur pénétration (Beugnet, Halos, Guillot 2018; Euzéby 1990; Bourdoiseau 2000).

d. Développement parasitaire chez l'hôte définitif

Après inoculation à l'hôte mammifère, les L3 migrent dans le tissu conjonctif sous-cutané et le tissu musculaire au lieu même d'inoculation. Les larves y séjournent durant 60 à 80 jours en moyenne (Beugnet, Halos, Guillot 2018). Pour une grande proportion des individus, la mue en L4 s'effectue aux alentours du 10^{ème} jour après pénétration et peut se poursuivre jusqu'au 12^{ème} jour. Une fois achevée, les L4 avancent au travers des muscles du thorax où elles vont séjournent durant de nombreux jours. Aux alentours du 60^{ème} jour post-infestation, les larves muent en L5 aussi appelés "adultes immatures". Elles circulent dans les muscles et atteignent une veine périphérique. La voie de passage du tissu musculaire vers la circulation veineuse n'est pas totalement élucidée à ce jour. La circulation sanguine conduit alors les individus jusqu'aux artères pulmonaires au niveau du cœur droit dès le 67^{ème} jour après l'infestation. On considère qu'au 120^{ème} jour, la totalité des L5 a rejoint la vascularisation pulmonaire (**Figure 5**). Les premiers individus à atteindre les vaisseaux mesurent en moyenne 2 à 3 cm de long. Une croissance exponentielle débute alors. Les vers atteignent ainsi la longueur de 10 cm à 4 mois post-inoculation et de 20 à 30 cm pour les femelles, après 6 mois et demi (Bowman, Atkins 2009). Parallèlement à cette phase de croissance, après 7 semaines passées dans la circulation pulmonaire, les larves effectuent une migration rétrograde vers le ventricule droit. Elles y deviendront des adultes matures sexuellement. Ainsi, au 120^{ème} jour après inoculation, les premiers individus atteignent la maturité sexuelle (Beugnet, Halos, Guillot 2018). Il faudra cependant attendre un minimum de 180 à 210 jours post-inoculation pour que la production de microfilaries commence. Celle-ci consiste en un développement des œufs au sein de l'utérus d'une femelle adulte puis émission par l'orifice vulvaire. La libération de microfilaries par la femelle au sein du flux sanguin de l'hôte définit la "période pré-patente" (ESCCAP 2011).

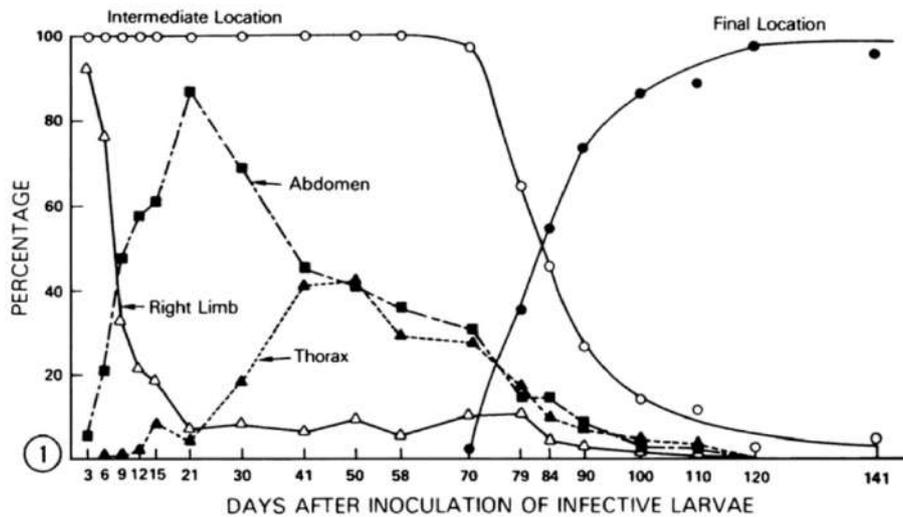


Figure 7 : Distribution et migration des larves de *Dirofilaria immitis* chez des chiens inoculés expérimentalement (Bowman, Atkins 2009)

La quantité de microfilaries en circulation dans le sang des chiens infestés subit des variations saisonnières et nyctémérales (Ionică et al. 2017). En effet, les taux de microfilaries circulantes atteignent leur maximum au moment du crépuscule et durant la nuit, pour une période s'étendant du printemps et à l'été (Rhee, Yang, Kim 1998; Lovis et al. 2017). Ces périodes de microfilarémie maximale correspondent avec exactitude au pic d'activité de nombreuses espèces de moustiques ayant la capacité d'être vectrices de *D. immitis*.

Chez les chiennes gestantes, les microfilaries peuvent traverser le placenta et être décelées dans le sang des chiots. Il est à noter cependant qu'elles ne constituent pas une forme infestante et qu'il n'existe donc pas de transmission *in utero* de la dirofilariose cardiopulmonaire, car le passage par le moustique est obligatoire.

Les microfilaries peuvent survivre jusqu'à 2 ans et demi au sein de l'individu hôte, après inoculation expérimentale. Les adultes, quant à eux, survivent entre 5 et 7 ans mais les femelles deviennent moins prolifiques après 3 ans. En l'absence d'immunité développée par l'hôte définitif, les parasites adultes peuvent s'accumuler au cours des mois et des années, menant à des infestations sévères et à l'apparition progressive de signes cliniques (Beugnet, Halos, Guillot 2018).

e. Transmission des larves L3 infestantes à l'hôte définitif

La transmission des larves L3 infestantes ne peut avoir lieu qu'en présence :

- D'un nombre suffisant d'hôtes définitifs microfilariques (10 à 20% des chiens atteints sont amicrofilariques (Beugnet, Halos, Guillot 2018)
- D'hôtes vecteurs (moustiques femelles du genre *Aedes* ou *Culex* en Nouvelle-Calédonie principalement)
- D'un climat favorable à la reproduction et au développement des hôtes vecteurs et à l'acquisition du caractère infestant du parasite chez l'hôte intermédiaire/vecteur.

i. Impact de l'humidité

Un pourcentage d'humidité important favorise la reproduction des populations de moustiques (Drakou et al. 2020). Le pourcentage d'humidité optimal est de 65%. Le nombre total de vecteurs est ainsi directement corrélé au pourcentage d'humidité et aux précipitations qui ont lieu. Ceci est lié aux lieux de ponte des principaux genres de moustiques présents sur le sol français. En effet, les *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* pondent leurs œufs sur une surface d'eau. La transmission de la dirofilariose étant directement liée avec la densité de vecteurs en activité, les régions tropicales et humides, telles que la Nouvelle-Calédonie, constituent des environnements favorables à la dissémination des parasites.

ii. Impact de la température

Afin qu'il y ait développement de la L3 chez l'hôte intermédiaire, une température ambiante minimale de 14-15°C est nécessaire (Euzéby 1990). À des températures inférieures, la larve n'arrive pas à maturité. Le moustique n'est donc pas à risque de transmission du parasite. De plus, l'activité de recherche de repas sanguins est maximale à des températures comprises entre 15 et 24°C (Drakou et al. 2020).

Les scientifiques se basent sur le *Dirofilaria* Degree Day Unit (DU) pour établir un calendrier de transmission. Il correspond sur une journée à la différence entre le seuil des 14-15°C et la température moyenne à laquelle le vecteur et la larve sont exposés. Par exemple, si sur 24 heures la température moyenne est de 26°C, c'est environ 12°C au-dessus du seuil : la larve accumule 12 DUs. Une larve L3 de *D. immitis* a besoin de 130 DUs pour être infestante, soit 10 à 12 jours à 26°C (Bowman, Atkins 2009). En considérant des températures moyennes, le caractère infestant est acquis en 16 jours environ dans les pays tempérés. Cependant, ces durées sont obtenues en considérant une température journalière moyenne. Or les variations de

température au cours d'une même journée peuvent diminuer considérablement le nombre de jours nécessaires afin de cumuler 130 DUs (Ledema, Harrington 2011).

De plus, la transmission des L3 infestantes est directement corrélée à l'activité du moustique. Les moustiques sont des organismes poïkilothermes. Leur métabolisme et leur activité sont donc soumis à la température ambiante et à ses variations. Chaque intervalle de température optimal à la réalisation d'une activité (recherche d'un hôte, prise du repas sanguin, ...) est spécifique d'une espèce.

Par exemple, les intervalles de température permettant l'activité d'*Aedes aegypti*, vecteur de *D. immitis* en Nouvelle-Calédonie, ont été répertoriés (Reinhold, Lazzari, Lahondère 2018). Sa recherche d'hôte est optimale entre 15 et 32°C alors que la prise de repas sanguin est possible entre 15 et 36°C. L'ensemble des fonctions de nutrition et de reproduction est optimal entre 25 et 28°C. Il est également important de noter que la survie des moustiques est compromise à des températures inférieures à 14°C et supérieures à 37°C (Ernst, Slocombe 1983).

En Nouvelle-Calédonie, la proximité du Tropique du Capricorne conduit à des températures mensuelles moyennes comprises entre 17°C pour les mois frais de juillet et août et 30°C pour la période estivale comprenant les mois de décembre à février. Lors du pic d'activité des moustiques (tôt le matin et en fin d'après-midi), les températures observées sont douces et bien souvent compatibles avec la recherche de repas. Les conditions environnementales de la Grande Terre et des Loyautés constituent des optima de température et d'humidité pour le développement et la transmission de *D. immitis*.

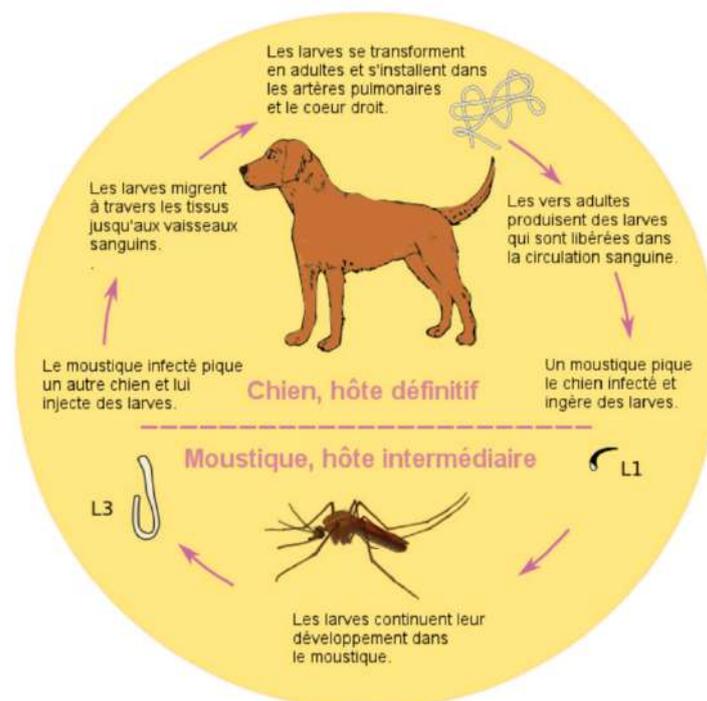


Figure 8 : Cycle de vie parasitaire de *Dirofilaria immitis* (Anka Friedrich 2013)

En outre, les fluctuations de température actuelles conduisent à une extension de la période à risque mais aussi des espaces à risque. Elles sont la conséquence des changements climatiques (accroissement des températures moyennes). Elles conduisent à une expansion de la zone d'enzootie de la dirofilariose cardiopulmonaire en direction notamment des pays d'Europe du Nord. D'autre part, les constructions humaines forment des « îlots de chaleur », c'est-à-dire des zones qui accumulent de la chaleur pendant la journée pour la retransmettre la nuit (**Figure 9**). Ces espaces deviennent compatibles avec la survie des moustiques, le développement rapide de *D. immitis* et donc sa transmission, même durant des saisons où la température diminue la nuit (Morchón et al. 2012; American Heartworm Society 2014).

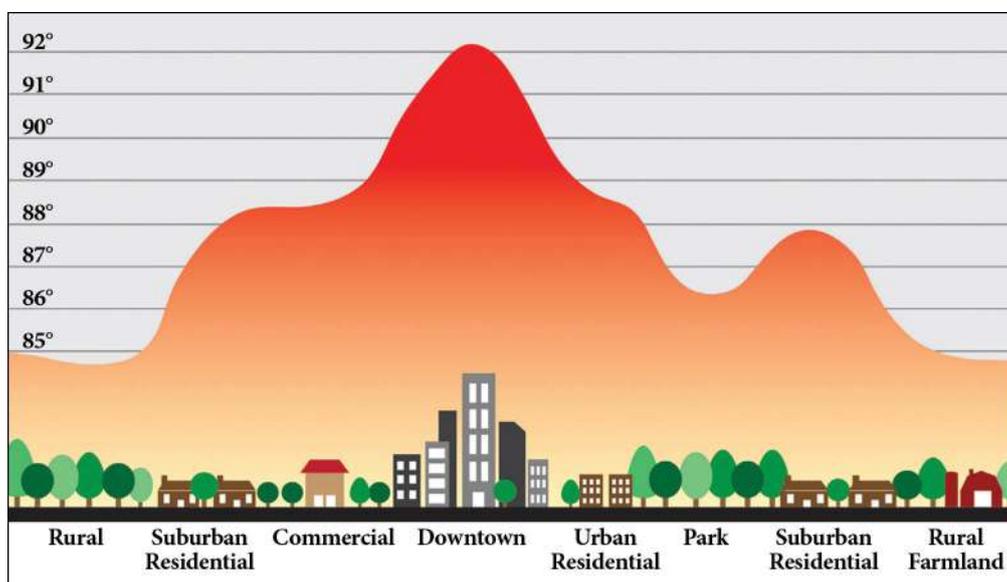


Figure 9 : Schéma d'un îlot de chaleur (Public Health Note 2018)

III. *Wolbachia pipientis*, bactérie symbiotique de *D. immitis*

1. Présentation de *Wolbachia pipientis* : une alphaprotéobactérie

Wolbachia pipientis est une alpha-2-protéobactérie appartenant à l'ordre des *Rickettsiales* (Kennedy, Harnett 2001). C'est une bactérie Gram négative intracellulaire stricte, se retrouvant dans l'organisme de filaires et d'arthropodes.

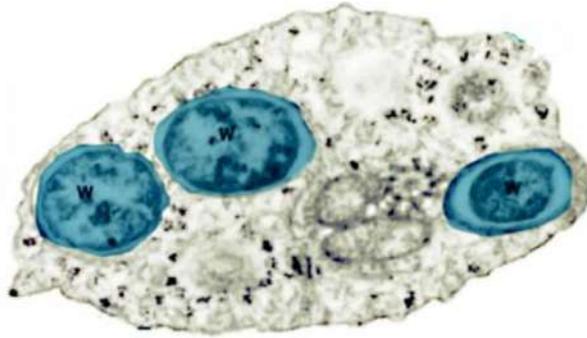


Figure 10 : Photographie au microscope électronique à transmission de Wolbachia pipientis au sein d'une cellule d'insecte. Les bactéries Wolbachia sont mises en évidence par la couleur bleue et la lettre "W" (Scott O'Neill 2004)

Cette bactérie est présente uniquement chez deux sous-familles : les Onchocercinae et les Dirofilarinae. Les données indiquent que la presque totalité des espèces de filaires pathogènes de l'Homme et de l'animal sont concernées (LePage, Bordenstein 2013). Les espèces infectées incluent de façon non exhaustive des espèces du genre *Onchocerca*, *Wuchereria*, *Mansonella*, ... mais également *D. repens* et *D. immitis*. L'association symbiotique entre ces deux populations est un phénomène long et stable, dans l'objectif d'une survie commune.

2. Endosymbionte des filaires : *Wolbachia*

a. Localisation

Wolbachia, la bactérie endosymbiotique, a été observée chez l'adulte, la microfilaire, les L2, L3 et L4 de *D. immitis*. *Wolbachia pipientis*, chez l'adulte de *D. immitis*, est retrouvée sous forme de petites colonies dans les cellules hypodermiques des cordes latérales (**Figure 11**) (Galvis, Ovallos 2020). Chez les filaires femelles, elle est également retrouvée dans les ovaires, les oocytes et dans les embryons en développement. Leur transmission se fait par voie transovarienne.



Figure 11 : Photographie de *Wolbachia pipientis* observées au microscope optique et mises en évidence par immunohistochimie au sein des cordes latérales d'un adulte de *Dirofilaria immitis*. Les « *Wolbachia Surface Protein* » sont identifiées par la coloration rouge (MSD Manual, Kramer L. 2023)

b. Bénéfices réciproques et implications de l'association symbiotique

L'association symbiotique entre *Wolbachia* et les filaires de *D. immitis* est une relation mutualiste (à bénéfices réciproques) et obligatoire. La bactérie est indispensable à la survie, au développement et la reproduction des filaires. De nombreuses études menées *in vitro*, ont montré qu'un traitement antibiotique dirigé contre les *Wolbachia*, permettait une diminution drastique du nombre de bactéries viables mais aussi une diminution de la mobilité, et dans certains cas par extension, la mort des filaires (Rossi et al. 2010; Kramer et al. 2018).

Il a par ailleurs été montré que l'élimination des bactéries entraîne une diminution du développement larvaire chez les stades pré-adultes ainsi qu'un retard de développement chez les adultes. En 2000, Smith et Rajan ont montré qu'une administration de tétracycline avant la mue des L3 en L4, interrompait le développement larvaire, chez trois espèces de filaires dont *D. immitis*. En 2008, McCall et al. ont démontré qu'un traitement à base de doxycycline pendant la période de développement larvaire (de L3 à L4) inhibait la croissance des filaires et le développement en filaire adulte. La même équipe (McCall et al., 2008 ; 2014) a montré qu'un mois d'administration de doxycycline chez un hôte infesté conduisait à une diminution progressive de la microfilarémie. En 2011, Landman conclue que le mécanisme induisant le blocage de l'embryogénèse à la suite de l'élimination des *Wolbachia* serait l'apoptose. Les endobactéries semblent agir comme "inhibiteurs" de l'apoptose des cellules de la lignée

germinale et des embryons de filaires. L'élimination de *W. pipientis* entraîne ainsi une interruption de l'embryogénèse à l'origine d'une diminution du nombre de microfilaires.

c. Échappement à la réponse immunitaire

La durée de vie d'une filaire sans endosymbionte se limite à une année en moyenne (Hansen et al. 2011). *A contrario*, *D. immitis* présente une longévité de 5 à 7 ans. Cette longévité serait donc largement dépendante de la présence des endobactéries. *Wolbachia* est à l'origine d'un détournement spécifique de la réponse immunitaire de l'hôte définitif. La filaire échappe par ce mécanisme au système immunitaire : la bactérie est donc responsable de la survie au long terme de *D. immitis*. Dans son étude de 2011, Hansen décrit le mécanisme à l'origine de ce détournement : les bactéries provoquent un recrutement exacerbé des neutrophiles. Cette arrivée massive empêche le recrutement des éosinophiles, population cellulaire destructrice des nématodes. De plus, l'exposition chronique aux antigènes bactériens modifie la réponse immunitaire et favorise la production de l'interleukine IL10 et de l'interleukine IL4, *down régulatrices* de l'inflammation.

IV. Pouvoir pathogène de *Dirofilaria immitis*

1. Pathogénie chez le chien

a. Microfilaires

Les microfilaires élaborent des antigènes dont la reconnaissance par le système immunitaire stimule la production d'anticorps agglutinants, d'IgG et d'IgE. Ces composés sont à l'origine de phénomène de cyto-adhérence des macrophages et des éosinophiles aux parasites. Ce processus est à l'origine de leur mort (Euzéby 1990). Cependant, toutes les microfilaires ne sont pas détruites et les individus restant jouent un rôle pathogène secondaire. De par leur taille, elles peuvent être à l'origine de phénomènes d'embolisation dans la microcirculation pulmonaire. Plus fréquemment, la présence de microfilaires entraîne le développement de lésions du parenchyme pulmonaire (Beugnet, Halos, Guillot 2018). En effet, certains individus développent une hypersensibilité lorsque les microfilaires sont libérées dans les capillaires pulmonaires. Le système immunitaire s'emballe et des cellules de l'immunité affluent pour éliminer les complexes immuns formés. L'arrivée de cellules immunitaires peut notamment

entraîner une pneumonie éosinophilique. De manière anecdotique, la réponse exacerbée du système immunitaire peut aussi conduire à la séquestration des microfilaires au sein d'un granulome constitué de neutrophiles et d'éosinophiles. Cette forme lésionnelle peut être associée à une lymphadénopathie bronchique (Bowman, Atkins 2009).

Les microfilaires de *D. immitis* peuvent sortir du flux sanguin et présenter des localisations ectopiques, atteignant ainsi l'encéphale, la moëlle épinière, les vaisseaux oculaires et même, dans certains cas, la chambre antérieure ou postérieure de l'œil (Beugnet, Halos, Guillot 2018).

b. Larves L1, L2 et L3

Similairement aux microfilaires, les larves immatures sont productrices d'antigènes. Une partie des antigènes produits est rejetée directement dans l'organisme de l'hôte. L'antigénicité de surface des parasites s'en trouve ainsi diminuée, favorisant de ce fait le processus d'évasion (Beugnet, Halos, Guillot 2018). C'est notamment le cas durant la phase de migration larvaire. Les antigènes peuvent également être à l'origine d'une réaction immunitaire éosinophilique lors de leur passage au sein des vaisseaux pulmonaires, à l'origine d'une pneumonie éosinophilique et de lésions des parois artérielles.

c. Adultes vivants

Les adultes de *D. immitis* ont une localisation intravasculaire. Les premières lésions surviennent dans les artères et le parenchyme pulmonaires. La sévérité des lésions observées dépend de la charge parasitaire, de la durée d'infestation et de l'activité physique du chien atteint.

Les individus hôtes souffrent d'une endartérite d'apparition progressive caractérisée par la présence de lésions anatomo-pathologiques. Le plus fréquemment, sont observés une prolifération des villosités de l'intima de l'artère (par agglutination de plaquettes et de globules blancs) ainsi que des dégâts endothéliaux et une desquamation. L'inflammation de l'arbre vasculaire pulmonaire entraîne l'arrivée et l'activation massive de leucocytes et de plaquettes. Ces deux entités libèrent alors des facteurs induisant la prolifération des cellules musculaires lisses avec accumulation de collagène et fibrose. De plus, la libération concomitante de thromboxanes mène à l'activation de phénomènes d'agrégation plaquettaire. Ces phénomènes conduisent à l'épaississement de la paroi musculuse des vaisseaux à l'origine d'une réduction

de la lumière vasculaire (Miron 2016). À la faveur de l'évolution de la maladie, un phénomène obstructif se met en place : les artères atteintes deviennent épaissies, dilatées et tortueuses, leur compliance est diminuée. Les artères distribuant les lobes pulmonaires caudaux sont les premières affectées. La circulation subit de plus une vasoconstriction :

- Due à la production exacerbée de substances vasoactives par les cellules endothéliales,
- Due à l'hypoxie causée par la dualité effet shunt et effet espace-mort en lien avec les phénomènes obstructifs et les lésions parenchymateuses (thrombo-embolie, pneumonie, ...)

La circulation sanguine en provenance du cœur droit est alors perturbée et une hypertension pulmonaire survient. Cependant, l'occlusion vasculaire est progressive et rend possible la mise en place d'une circulation pulmonaire collatérale. Celle-ci, en partie compensatoire, permet de limiter le risque d'infarctus du poumon. De la même manière, l'obstruction mécanique par des filaires adultes est rarement à l'origine de signes cliniques. La circulation collatérale permettant la vascularisation pulmonaire, une charge parasitaire extrêmement élevée est requise afin d'en contrer les effets.

Secondairement à l'épaississement de l'endothélium et à l'altération des jonctions cellulaires, la perméabilité vasculaire augmente. Ce phénomène peut mener à la formation d'œdème périvasculaire par accumulation de fluides, en partie inflammatoire.

En raison de l'hypertension pulmonaire, l'anatomie du cœur droit s'adapte. Une hypertrophie concentrique puis excentrique s'installe en réponse à la surcharge barométrique. Le cœur droit se dilate et le myocarde s'épaissit (**Figure 12**). Une insuffisance secondaire de la valve tricuspide peut alors survenir. Dans certains cas, elle complique ou précipite la décompensation cardiaque. L'exercice physique intense chez des chiens infestés présentant ce type de lésions, conduit à une augmentation du débit sanguin impliquant un stress supplémentaire sur la pompe cardiaque.

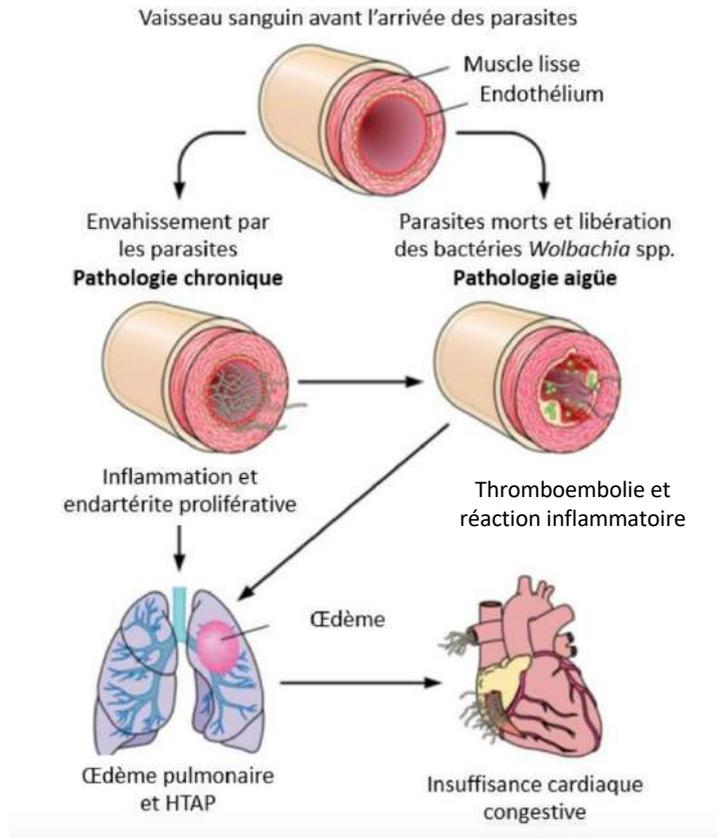


Figure 12 : Schéma de l'évolution des lésions cardiopulmonaires lors d'infestation par D. immitis (Simón et al. 2012)

Dans le cas d'infestation massive, ou bien à une forte charge parasitaire chez un chien de petit format, les vers peuvent être régurgités depuis les artères vers le cœur droit. Ce phénomène est suspecté être la conséquence d'un manque d'espace au sein des vaisseaux ou bien d'une modification importante des pressions sanguines. Les vers adultes, rejetés dans l'atrium et le ventricule droit par la circulation, pénètrent dans la veine cave. Une hémolyse massive se produit, à l'origine de nombreux signes cliniques (pâleur des muqueuses, augmentation du temps de recoloration capillaire, ...) et conduisant au "syndrome de la veine cave". C'est une urgence absolue nécessitant un traitement chirurgical par retrait des vers du cœur droit.

Couramment, des lésions de glomérulonéphrite sont retrouvées chez les chiens parasités. Ces lésions sont dues au dépôt d'immuns complexes dans les glomérules rénaux. Ces complexes se forment par réaction d'hypersensibilité de type III, aussi appelé phénomène d'Arthus (Euzéby 1990). Les individus atteints présentent alors une protéinurie et de nombreux antigènes parasites sont retrouvés dans l'urine émise. L'insuffisance rénale accompagne rarement les modifications anatomopathologiques (Euzéby 1990; Bourdoiseau 2000; Miron 2016; Beugnet, Halos, Guillot 2018; ESCCAP France 2023).

d. Adultes morts

La mort des parasites adultes survient naturellement ou à la suite d'un traitement adulticide. Les adultes se décomposent et forment des fragments résiduels qui vont être entraînés par la circulation sanguine. Ces fragments pourront être à l'origine de thrombo-embolies dans les capillaires et les artères pulmonaires. Ainsi, ces phénomènes peuvent mener à une obstruction et une vasoconstriction réactionnelle, et ainsi conduire à des infarcti locaux pulmonaires.

La présence de ces fragments est également à l'origine d'inflammations locales. Les plaquettes sanguines au contact des antigènes parasitaires libèrent des thromboxanes. Ce sont des cytokines à effet vasoconstricteur et agrégant plaquettaire, pouvant déclencher une coagulation intravasculaire plaquettaire. Une inflammation granulomateuse ou bien la formation de villosités rugueuses inflammatoires surviennent en réponse à la présence des vers morts dans les vaisseaux. Dans certains cas, la restriction du flux sanguin secondaire à l'ensemble de ces lésions vasculaires est responsable de la consolidation des lobes pulmonaires affectés. Les vaisseaux inflammés, fragilisés et obstrués, sont alors davantage perméables. Ainsi, à la faveur d'une augmentation du flux artériel (dans le cas d'un exercice physique par exemple), des médiateurs de l'inflammation peuvent être libérés en grande quantité, exacerbant la maladie déjà en place (Miron 2016; Semat 2016; Beugnet, Halos, Guillot 2018).

Les artères pulmonaires lésées sont cependant en capacité de cicatriser. Ce mécanisme réparateur est également nocif puisque les vaisseaux se fibrosent. Ces modifications aggravent l'hypertension pulmonaire et l'insuffisance cardiaque droite déjà présentes.

2. Contribution de *Wolbachia pipientis*

La bactérie endosymbiotique participe également à la pathogénie de *D. immitis* au sein de la dirofilariose cardiopulmonaire. À l'heure actuelle, son rôle n'est cependant qu'en partie élucidé. De nombreuses études ont mis en lumière l'action pro-inflammatoire des bactéries. La présence des endobactéries jouent notamment un rôle au niveau de l'inflammation péri-vasculaire et de la prolifération endothéliale (Kramer et al. 2008). En effet, *W. pipientis* provoque la stimulation de nombreuses cellules de l'immunité telles que les macrophages, les neutrophiles, les monocytes et les cellules dendritiques. Les bactéries présentent des protéines de surface appelées "WSP" (Wolbachia Surface Protein). Leur reconnaissance intervient dans l'activation forte des récepteurs de reconnaissance antigénique, les TLR2 (Toll-Like Receptor 2) et les

TLR4. Cette activation conduit à la synthèse exacerbée de cytokines spécifiques (TNF α , IL12 et IL8) à l'origine d'un processus inflammatoire. La libération des cytokines pro-inflammatoires provoque le recrutement massif de neutrophiles. Ces cellules produisent de nombreux composés cytotoxiques provoquant une destruction tissulaire (Bouchery et al. 2013). De plus, les WSP ont une action inhibitrice de l'apoptose des neutrophiles. Ce mécanisme permet donc une persistance de l'inflammation. Enfin, les WSP jouent un rôle dans la surexpression d'une enzyme, la iNOs. Celle-ci est nécessaire à la production d'un médiateur de l'inflammation puissant : l'oxyde nitrique (NO).

Ces mécanismes exacerbent ceux secondaires à la présence des filaires. Ils aggravent de ce fait les lésions observées au sein de l'organisme de l'hôte définitif (Kramer et al. 2005; 2008; Galvis, Ovallos 2020; Hansen et al. 2011; Semat 2016).

3. Potentiel zoonotique de *Dirofilaria immitis*

En 2012, 33 cas de dirofilariose cardiopulmonaire ont été recensés en Europe (Fontes-Sousa et al. 2019). Il est fortement suspecté que ces chiffres soient en deçà du nombre de cas réels compte tenu de la complexité du diagnostic.

L'infestation de l'Homme est accidentelle et a presque exclusivement lieu dans des régions endémiques de *D. immitis*. L'Homme se contamine par la piqûre d'un moustique infesté. Les larves muent alors en L4. Celles-ci se bloquent et meurent au sein de la circulation sanguine, formant des structures kystiques dans les différentes branches des artérioles pulmonaires. L'Homme étant un cul-de-sac épidémiologique, le cycle parasitaire de *D. immitis* est interrompu et la production de microfilaires impossible.

L'infestation par *D. immitis* chez l'Homme est généralement asymptomatique. Dans de rares cas, certains patients atteints présentent des signes respiratoires non spécifiques : toux, dyspnée, douleurs thoraciques, hémoptysie et fièvre. Ces nodules sont donc généralement une découverte fortuite au cours d'un examen d'imagerie médicale. La structure apparaît homogène à contour bien définis : on parle de pneumonie en "pièce de monnaie". La lecture radiographique ne permet pas la différenciation entre kystes parasitaires et lésions tumorales. La biopsie des nodules pour analyse histologique constitue alors la méthode diagnostique de choix. Le caractère invasif du geste reste toutefois limitant quant à sa mise en place (Fontes-Sousa et al. 2019; Otranto et al. 2013).

La migration erratique de larves L3 existe aussi chez l'Homme. De rares cas de dirofilariose oculaire et/ou sous-cutanée sont décrits dans les zones d'endémie (Aykur et al. 2021).

V. Signes cliniques chez le chien infesté

1. Forme chronique ou "classique"

La dirofilariose cardiopulmonaire évolue généralement de manière asymptomatique sur plusieurs mois à plusieurs années. Le délai d'apparition des signes cliniques dépend du nombre d'adultes présents dans les artères pulmonaires et de l'activité physique de l'animal. En effet, Dillon, Brawner et Hanrahan, en 1995, ont montré que la sévérité des lésions pariétales des artères était directement corrélée à l'activité physique du chien infesté. Des facteurs secondaires peuvent également être considérés quant à l'apparition, ou non, de signes cliniques et à leur sévérité :

- la charge relative en vers, c'est-à-dire le nombre de vers adultes ramené au poids de l'animal
- la durée d'infestation par les filaires
- la réponse immunitaire individuelle de l'animal infesté

En Europe, les faibles charges parasitaires des individus atteints engendrent majoritairement des formes asymptomatiques. En revanche, en Nouvelle-Calédonie et dans les DROM-COM français, du fait de la pression d'infestation supérieure, les charges parasitaires observées engendrent plus fréquemment des signes cliniques. La forme la plus fréquemment observée est alors la forme chronique, ou dite "classique", pour laquelle trois stades cliniques sont décrits. L'évolution de la maladie dépend de l'aggravation des lésions et des pathologies cardiovasculaires et respiratoires.

a. Classe I : Phase de début ou forme frustrée

Durant cette phase, les signes cliniques sont discrets et le diagnostic difficile à établir. Le chien présente parfois un état général modifié associé à un amaigrissement chronique et une perte d'appétit. Les propriétaires peuvent rapporter une intolérance à l'effort et une fatigabilité excessive (Euzéby 1990; Bourdoiseau 2000; Beugnet, Halos, Guillot 2018).

Cette forme est associée à une infestation légère : la charge parasitaire est faible. L'infestation est microfilarémique ou non. Les lésions cardiovasculaires associées et la pathologie cardiaque

sont donc légères et le cœur compense l'hypertension pulmonaire. La maladie est encore subclinique et environ 23% des chiens à ce stade sont asymptomatiques (Bourdoiseau 2000).

b. Classe II : Phase d'état modérée

Un nombre de filaires adultes important dans les artères pulmonaires est associé à cette phase. La charge parasitaire est suffisante pour conduire à une hypertension pulmonaire et à un remodelage cardiaque. Le cœur droit s'hypertrophie et la pathologie cardiaque se crée insidieusement. Chacun de ces phénomènes se met en place progressivement. Ainsi, l'apparition des signes cliniques associés peut se faire sur plusieurs mois. L'animal infesté présente une intolérance à l'effort s'accompagnant parfois d'une dyspnée, un amaigrissement et une atteinte de l'état général. Ces signes cliniques sont facilement détectables par les propriétaires et lors de l'examen clinique. Au repos, le chien atteint est essoufflé.

L'hypertrophie cardiaque exerce une pression mécanique sur la trachée, conduisant à une toux sèche sporadique. L'examen minutieux de l'appareil circulatoire permet parfois la mise en évidence d'anomalies : muqueuses pâles compatibles avec une anémie, bruits cardiaques anormaux, signes d'insuffisance hépatique ou rénale débutante ... Ce stade clinique correspond à un état d'insuffisance cardiaque droite compensée (Beugnet, Halos, Guillot 2018; Bourdoiseau 2000; Guillot 2008).

c. Classe III : Phase d'état sévère

Les mécanismes compensateurs de la pathologie cardiaque ne fonctionnent plus : l'animal souffre d'une insuffisance cardiaque droite congestive décompensée.

L'état général de l'animal est altéré : il apparaît amaigri, en moyen à mauvais état. Les propriétaires rapportent une intolérance à l'effort ainsi que des anomalies de prise alimentaire allant d'une dysorexie à une anorexie. Ils notent une certaine léthargie.

Le remodelage cardiaque est tel que la toux est alors persistante et profonde. L'atteinte des voies respiratoires s'accompagne généralement d'une dyspnée à l'effort et/ou au repos. À l'examen, les muqueuses apparaissent pâles. Une anémie est observable cliniquement et la perfusion périphérique est diminuée. Le chien infesté présente une tachycardie et un pouls fémoral filant. À l'auscultation cardiaque, un souffle cardiaque droit localisé dans l'aire d'auscultation de la valve tricuspide caractérisé comme "souffle systolique apexien droit", et

un dédoublement de B2 sont parfois entendus. Plus rarement, un bruit de galop peut être perçu lors de l'examen de l'animal. Dans certains cas, des bruits anormaux sont entendus à l'auscultation pulmonaire : des crépitements, des frottements ou une augmentation des bruits respiratoires (Castric 2002; Guillot 2008).

Ce qui différencie ce stade du précédent est majoritairement la décompensation cardiaque droite et les signes cliniques qui lui sont associés :

- hépatomégalie ("foie cardiaque") et splénomégalie ;
- ascite, œdèmes périphériques, épanchement pleuraux ;
- hydrothorax ;
- turgescence des veines jugulaires, pouls jugulaires rétrogrades ;
- épistaxis et hémoptysie pouvant aboutir à un choc hypovolémique

À ce stade, les conséquences lésionnelles de la présence des vers sont telles que la mort de l'animal est possible en l'absence de prise en charge médicale. De plus, les parasites sont parfois à l'origine de lésions rénales pouvant compliquer le tableau clinique (insuffisance rénale aigüe, glomérulonéphrite) (Castric 2002; Guillot 2008; Bowman, Atkins 2009; Semat 2016).

2. Forme aigüe

a. Syndrome de la veine cave

La quatrième classe de la forme classique correspond à l'une des formes aigües de la dirofilariose cardiopulmonaire. Il s'agit du syndrome de la veine cave. C'est un syndrome d'apparition brutale nécessitant une prise en charge en urgence. Le pronostic vital de l'animal qui en souffre est engagé.

Il s'observe principalement lors d'infestations massives (plus de 50 filaires adultes) survenant chez des chiens non traités (Castric 2002). C'est donc une forme clinique extrêmement rare en France métropolitaine, mais décrite dans les DROM-COM dont la Nouvelle-Calédonie. Les filaires adultes migrent des artères pulmonaires vers le cœur droit et la veine cave caudale menant à un état de choc cardiogénique. Les vers sont enchevêtrés au niveau de la valve tricuspide et créent des turbulences du flux sanguin. Les hématies sont ainsi détruites au passage du bouchon vermineux formé. L'animal souffre d'un syndrome hémolytique.

Cliniquement, il présente alors une hémoglobinémie, une hémoglobinurie et une anémie (Villeneuve 2014; Semat 2016).

De plus, à l'admission, une tachycardie, une tachypnée voire une dyspnée peuvent être rapportés, auxquelles s'ajoutent l'ensemble des signes cliniques de la classe III.

La coexistence du syndrome hémolytique et de l'état de choc cardiogénique entraîne la mort de l'animal touché en 24 à 72 heures, en l'absence de prise en charge. Le traitement chirurgical consiste en l'extraction des filaires adultes du cœur droit (Beugnet, Halos, Guillot 2018).

b. Forme thrombo-embolique

Il s'agit de complications de la dirofilariose cardiopulmonaire d'apparition brutale. Elles surviennent de façon spontanée ou entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour suivant un traitement adulticide (Villeneuve 2014).

i. Thrombo-embolie pulmonaire

Comme décrit précédemment, des thrombus vermineux ou des fragments de filaires morts sont parfois mis en circulation. Ils peuvent être à l'origine d'obstruction des vaisseaux pulmonaires : on parle alors de thrombo-embolie pulmonaire. Elle peut survenir de façon spontanée ou bien consécutivement à un traitement filaricide (entre 7 jours à 1 mois après administration). L'apparition des signes cliniques est rapide et ils diffèrent peu de ceux observés lors de syndrome de la veine cave. Le chien présente de l'hyperthermie, une tachypnée, parfois associée à une dyspnée, une tachycardie, de la toux et bien souvent de l'épistaxis et/ou de l'hémoptysie (Villeneuve 2014).

ii. Troubles de la coagulation

La reconnaissance des antigènes parasitaires par le système immunitaire entraîne un état inflammatoire systémique. Ce phénomène conduit à la libération de cytokines à effet agrégant plaquettaire. Un état d'hypercoagulabilité se met alors en place. Des micro-thrombi se forment menant à des lésions ischémiques locales. L'organisme répond en activant les mécanismes fibrinolytiques : la situation s'inverse et un état d'hypocoagulabilité s'installe. Biologiquement, les plaquettes et les facteurs de la coagulation sont consommés. Conjointement, la

concentration en fibrinogène et produits de dégradation de la fibrine dans le sang augmente. L'animal va alors présenter des saignements diffus et incoercibles sous forme d'hémorragies :

- de l'arbre respiratoire : épistaxis, hémoptysie ;
- cutanées et/ou sous cutanées : purpura, pétéchies ;
- digestives : méléna, hématochézie, hématomèse ;
- urinaires : hématurie ;
- cavitaire : hémoperitoine, hémothorax.

Le pronostic vital de l'animal est mauvais en l'absence de prise en charge adaptée de la coagulopathie et de la thrombo-embolie (Castric 2002; Guillot 2008; Villeneuve 2014).

iii. Thrombo-embolie parasitaire

Ce phénomène est similaire aux thrombo-embolies pulmonaires mais concernent d'autres localisations. En effet, les débris de filaires mortes suite à un traitement adulticide se logent parfois au niveau des capillaires glomérulaires, sous-cutanés et des structures nerveuses. Des lésions ischémiques des organes considérés suivent le phénomène obstructif. Ces anomalies vasculaires conduisent à des pathologies organiques (insuffisance rénale par exemple) et/ou à des lésions anatomopathologiques objectivables dès l'examen clinique. En effet, lors d'embolisation de la vascularisation artérielle du tissu sous-cutané, les portions non perfusées subissent un phénomène de nécrose. Les débris parasitaires peuvent également obstruer les artères iliaques conduisant à une myopathie ischémique des membres postérieurs. L'animal présente alors une douleur musculaire au niveau des membres pelviens. Celle-ci est associée parfois à une boiterie ou une faiblesse du train arrière, voire à de la nécrose des tissus cutanés et sous cutanés par défaut de perfusion. Le dernier stade d'évolution de la myopathie ischémique est la gangrène des membres pelviens (Castric 2002; Guillot 2008).

3. Forme occulte

On parle de "forme occulte" dans le cas de dirofilariose cardiopulmonaire amicrofilarémique. Aucune microfilaire n'est alors mise en évidence dans la circulation sanguine. De nombreuses causes peuvent l'expliquer :

- infestation encore en phase prépatente ;

- présence de filaires adultes du même sexe ou infestation monoparasitaire ne permettant pas la reproduction ;
- vers adultes trop âgés (chute de ponte des femelles après 3 ans) ;
- vers stérilisés par un traitement dont l'efficacité n'a pas été totale ;
- individus hôtes ayant acquis une immunité (Semat 2016; Beugnet, Halos, Guillot 2018).

Dans ce dernier cas, la totalité des microfilaires n'est souvent pas détruite. Les individus restants sont immobilisés dans les capillaires pulmonaires ou rénaux. Ils sont alors à l'origine de signes cliniques principalement respiratoires. Leur présence s'exprime par la formation de granulomes et d'une pneumonie éosinophilique (Euzéby 1990; Bourdoiseau 2000). Les lésions sont telles qu'un dysfonctionnement alvéolaire les accompagne fréquemment. De plus, la réaction immunitaire associée à la reconnaissance des microfilaires conduit à la formation d'immuns complexes de type III (phénomène d'Arthus) au sein du parenchyme pulmonaire ou bien du glomérule rénal. Selon les auteurs, 25 à 60% des individus atteints de dirofilariose cardiopulmonaire présenteraient une forme occulte (Guillot 2008).

4. Formes atypiques

a. Forme oculaire

Les premiers cas de dirofilariose oculaire ont été décrits dans les années 1960-70, dans des régions hautement endémiques telles que l'Australie et les États-Unis. En Europe, le premier cas décrit date de 2009 et concerne un chien de la région du sud de l'Italie.

La forme oculaire de la dirofilariose se manifeste cliniquement par un blépharospasme, un œdème cornéen et une hyperhémie épiscérale (Dantas-Torres et al. 2009). Dans les cas les plus sévères, un glaucome secondaire à une uvéite hypertensive peut être observé. Ces signes sont la conséquence de la migration erratique d'un parasite vers la chambre antérieure de l'œil. Le diagnostic est alors aisé puisque la filaire est observable par examen ophtalmologique direct. Un long filament blanchâtre (larve de filaire de stade 5) flotte librement au sein de l'humeur aqueuse. La prise en charge est uniquement chirurgicale et consiste en l'extraction du parasite. Du fait de l'inflammation causée par la présence du nématode, des complications et des séquelles peuvent persister (synéchies, sacs de fibrine, ...). Cette forme reste anecdotique puisqu'à l'échelle européenne, de très rares cas ont aujourd'hui été décrits dans la littérature.

b. Forme neurologique

Cette forme est associée à la présence d'embolies parasitaires dans l'appareil vasculaire du système nerveux central de l'animal (**Figure 13**). Ces embolies peuvent résulter de filaires adultes ou de microfilaires. La localisation lésionnelle définit le tableau clinique du syndrome neurologique. Ainsi, une incoordination motrice, une ataxie et des déficits locomoteurs tels qu'une parésie ou une paralysie, peuvent être décrits lors d'atteinte médullaire. En cas de lésions cérébrales, l'animal peut présenter des modifications comportementales, un port de tête anormal associé, ou non, à une marche en cercle, une amaurose et des crises convulsives (Beasley et al. 2021).



Figure 13 : Visualisation d'un adulte de Dirofilaria immitis durant une procédure de laminectomie dorsale (au niveau de l'espace intervertébral C3 - C4) chez un chien (Beasley et al. 2021)

Il est cependant important de noter que les syncopes parfois observées chez les animaux atteints de dirofilariose ne sont pas consécutives à la présence d'un parasite au sein du système nerveux central mais bien à l'insuffisance cardiaque, à l'origine d'une hypoxie cérébrale.

c. Forme cutanée

Les lésions cutanées sont associées à différents stades de la dirofilariose (classe I, II et III de la forme "classique"). Les mécanismes à l'origine de ces manifestations sont variés :

- la migration erratique de filaires adultes à l'origine de la formation de granulomes, d'abcès ou de kystes en région sous-cutanée : il s'agit de la forme pseudo-tumorale.
- l'obstruction de capillaires cutanés par des microfilaires circulantes conduisant à des foyers de nécrose cutanés : il s'agit de la forme nécrotique.

- la présence des filaires au sein du tissu sous-cutané peut être à l'origine d'une réaction immunitaire d'hypersensibilité de type I ou IV. Nommée "forme pseudo-eczémateuse", l'aspect lésionnel se caractérise par des lésions suintantes et dépilées au niveau des plis, du ventre, de la base des oreilles, ... associées à du prurit (Castric 2002; Semat 2016).

VI. Méthodes de diagnostic expérimental

1. Éléments d'orientation diagnostique : biologie clinique et imagerie médicale

Le diagnostic clinique de la dirofilariose cardiopulmonaire est fondé en première ligne sur des éléments épidémiologiques. Les individus touchés sont majoritairement des chiens "d'extérieur", vivant ou ayant séjourné en zone d'endémie. Quand bien même l'examen clinique de l'animal est en faveur d'une atteinte par *D. immitis*, le recours à des examens complémentaires est nécessaire à la confirmation du diagnostic.

a. Biochimie clinique

La réalisation d'un bilan biochimique et hématologique est intéressante pour le diagnostic, bien que non spécifique. Il permet également mais surtout l'évaluation pronostique et l'établissement d'un plan de prise en charge adapté. Ce bilan doit permettre d'évaluer :

- les paramètres de la fonction rénale afin de mettre en évidence une insuffisance rénale (**Tableau 2**). Son origine est généralement pré-rénale. Une protéinurie est présente dans 10 à 30% des cas dès la classe II de la maladie. Elle évolue avec l'avancement de la pathologie vers la classe III. Elle peut être présente bien avant que l'altération rénale soit décelable à l'évaluation des autres paramètres rénaux (urée, créatinine) (Carretón et al. 2020). Ainsi, la mesure de la protéinurie est un bon indicateur des lésions rénales. Dans de rares cas, la protéinurie s'accompagne d'une hypoprotidémie traduisant un syndrome néphrotique et assombrissant le pronostic.
- les paramètres hépatiques modifiés en cas de congestion hépatique ou "foie cardiaque" secondaire à l'insuffisance cardiaque droite.

*Tableau 2 : Modifications biochimiques les plus fréquemment rencontrées lors de dirofilariose cardiopulmonaire à *Dirofilaria immitis* (Bowman, Atkins 2009)*

Paramètres rénaux	Augmentation de la créatininémie et de l'urémie (dans 5% des cas), valeur de la SDMA supérieure à l'intervalle dans 4% des cas environ (Carretón et al. 2020)
Paramètres hépatiques	Augmentation des marqueurs de cytolysé hépatique (ALAT, ASAT) et des facteurs de cholestase (PAL, GGT) (dans 10% des cas)
Marqueurs de l'inflammation	Augmentation des protéines totales et diminution du rapport albumine/globuline

Comme évoqués précédemment, de nombreuses anomalies de l'hémostase sont rencontrées lors d'infestation à *D. immitis*. La réalisation d'une numération formule sanguine aide la détection de phénomènes de coagulation intravasculaire disséminée, de thromboses, ou de facteurs facilitant l'apparition de saignements (thrombocytopénie). Lors d'infestations parasitaires majeures, une anémie arégénérative modérée peut être notée à l'examen (Bowman, Atkins 2009; Kryvoruchenko 2022). L'anémie est alors secondaire à une hémolyse mécanique des globules rouges.

De plus, l'inflammation causée par la présence des parasites causent régulièrement une modification de la formule leucocytaire : une basophilie et/ou une éosinophilie sont souvent rapportées.

b. Radiographie

La radiographie thoracique est l'examen de choix dans l'évaluation des lésions cardiopulmonaires causées par *D. immitis*. Elle repose sur la réalisation de deux clichés du thorax en fin d'inspiration : l'un en vue de face et le second en vue de profil. Elle constitue une aide au diagnostic mais également à l'évaluation de la sévérité des lésions. Il n'existe toutefois aucune corrélation entre l'importance des lésions et le nombre de vers adultes présents au sein de l'individu.

Les principales modifications mises en évidence sont les suivantes (Bourdoiseau 2000; Castric 2002; Guillot 2008) :

- Élargissement des artères pulmonaires et modification de leur division. Les images en “branches d’arbre” habituelles se transforment en image en “buisson”. Les artères apparaissent alors déformées, irrégulières et parfois interrompues. Ces anomalies concernent en premier lieu la portion terminale de l’artère pulmonaire lobaire caudale droite. Elles s’étendent ensuite à la totalité du vaisseau, à l’artère lobaire crâniale droite puis quelques fois au tronc pulmonaire.
- Zones de densification pulmonaire correspondant à des lésions parenchymateuses et/ou alvéolaires. Ces zones se manifestent radiographiquement par une opacification alvéolaire et interstitielle (**Figure 14**). Lorsque la maladie évolue, ces aires de densification peuvent masquer les anomalies vasculaires à la radiographie thoracique.
- Cardiomégalie droite. Le ventricule droit se dilate. La silhouette cardiaque s’étend alors au niveau de la zone de projection du ventricule (de 6h à 10h sur un cadran d’horloge en vue dorso-ventrale). Lorsque la maladie avance, l’oreillette droite se dilate elle aussi. On parle d’image de cœur en “D inversé” (**Figure 14**). La trachée est également repoussée dorsalement à hauteur du hile.

Tableau 3 : Anomalies observées à la radiographie thoracique selon le stade d’évolution de la forme “classique” de la dirofilariose cardiopulmonaire (Bourdoiseau 2000; Castric 2002; Guillot 2008)

Classe	Anomalies thoraciques
Classe I = Phase de début	Absence de lésion visible Ou uniquement petites zones de densification périvasculaires circonscrites aux lobes caudaux
Classe II = Phase d’état	Élargissement léger des artères pulmonaires des lobes caudaux et irrégularités Opacification alvéolaire et interstitielle (densification) périvasculaire principalement aux lobes caudaux Dilatation du ventricule droit
Classe III = Phase sévère	Élargissement et déformation des artères pulmonaires caudales et crâniales, élargissement du tronc pulmonaire. Image en “buisson” : perte de l’arborisation artérielle Densification/opacification diffuse du parenchyme pulmonaire, compatible avec une thromboembolie pulmonaire ou une pneumonie allergique Cardiomégalie droite - cœur en “D inversé”

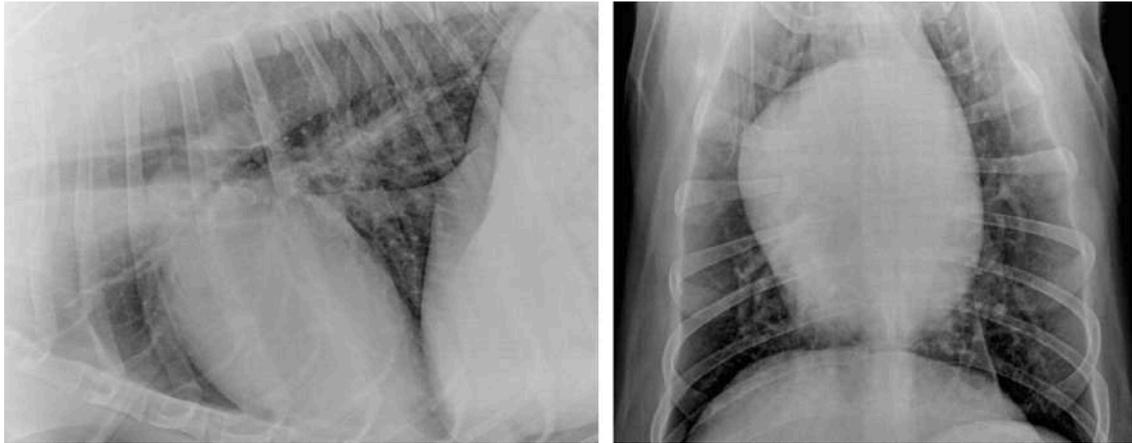


Figure 14 : Radiographies thoraciques de face et de profil d'un chien atteint d'une dirofilariose cardiopulmonaire modérée. A - Présence de lésions d'opacité alvéolaire. B - image de cœur en "D inversé" caractéristique d'une cardiomégalie droite (American Heartworm Society 2014)

c. Examen échographique

L'échocardiographie permet l'évaluation de la structure cardiaque et des lésions cardiovasculaires. Elle permet également la visualisation directe des filaires dans le cœur droit et la vascularisation pulmonaire. L'échocardiographie peut donc être une aide à l'estimation du nombre de filaires adultes. Les filaires adultes apparaissent à l'échographie comme deux structures linéaires hyperéchogènes et parallèles. Ces lignes correspondent aux parois riches en collagène, entourant la lumière hypoéchogène du parasite.

De plus, l'ensemble des conséquences de la présence des parasites sur l'appareil cardiovasculaire peut être apprécié à l'échographie : hypertrophie excentrique du ventricule droit, dilatation du ventricule et de l'oreillette droite, dilatation de l'artère pulmonaire principale et des ramifications, mouvements anormaux du septum, ... L'échocardiographie permet donc un diagnostic précoce, une quantification du nombre de vers adultes (lorsque les vers sont localisés dans une zone accessible aux ultrasons) et une évaluation des lésions qui y sont associées (Guillot 2008; American Heartworm Society 2014; Semat 2016).

De plus, l'échographie peut également être utilisée pour infirmer ou confirmer la localisation erratique de parasites.

d. Électrocardiogramme

L'électrocardiogramme (ECG) permet d'évaluer les anomalies d'activité électrique du cœur. Dans le cas de la dirofilariose cardiopulmonaire, il peut s'agir de fibrillation atriale, d'une

déviations de l'axe électrique droit ou d'une arythmie avec extrasystoles supraventriculaires. Cependant, ces modifications ne sont observables que lors de lésions sévères du cœur droit et de ce fait, à un stade très avancé de la maladie (insuffisance cardiaque droite et syndrome de la veine cave notamment) (Guillot 2008).

2. Détection et identification des microfilaires

a. Recherche des microfilaires dans le sang

Les microfilaires de *D. immitis* sont sanguicoles. Leur recherche s'effectue sur sang capillaire périphérique. Cette méthode reste insuffisante en tant que test diagnostique compte tenu de sa faible sensibilité et spécificité. De plus, de nombreux facteurs peuvent influencer la présence de microfilaires dans l'échantillon sanguin (cf. Partie 1, IV. 3.). La présence des microfilaires doit être appréciée principalement sur les bords et la frange de l'étalement. L'observation peut se faire sans coloration. Toutefois, le recours à une coloration de May-Grünwald-Giemsa doit être privilégiée car elle rend possible l'identification de l'espèce de filaire.

i. Examen direct d'une goutte de sang

L'examen direct d'une goutte de sang entre lame et lamelle est la méthode la plus utilisée en médecine vétérinaire. Cette technique permet d'atteindre une sensibilité de 61,25% chez les chiens microfilarémiques. Au microscope, sous lumière intense et à faible grossissement, les microfilaires sont mises en évidence par des mouvements anormaux des hématies. À grossissement plus important et diaphragme fermé, les parasites pourront être directement visualisables (**Figure 15**) (Ducos De Lahitte 1990).

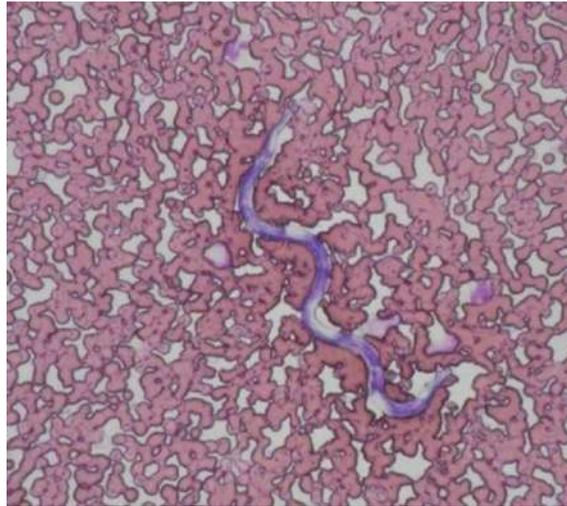


Figure 15 : Microfilaire de Dirofilaria immitis observée sur un frottis sanguin au microscope optique (x400), Site internet Orbio.fr

ii. Technique de la goutte épaisse

La technique de la goutte épaisse est beaucoup moins utilisée en médecine vétérinaire mais possède une sensibilité similaire à la technique précédente. Pour se faire, une goutte de sang capillaire périphérique est déposée au centre d'une lame et étalée à l'aide d'une lamelle sur un cercle d'environ 1 cm de diamètre par réalisation de mouvements rotatifs concentriques. La lame est ensuite séchée (24h à température ambiante ou 1h sous 37°C). Puis, elle est lavée dans de l'eau distillée afin de déshémoglobiner le prélèvement. La lame est alors séchée, fixée et colorée au May-Grünwald-Giemsa (Ducos Lahitte, 1990).

La faible sensibilité de ces tests de recherche directe est corrélée au site de prélèvement (Păstrav et al. 2018). En effet, la quantité de microfilaires dans un prélèvement de sang capillaire périphérique est inférieure à celle dans un prélèvement de sang veineux périphérique. D'après l'étude, cette différence est consécutive à l'absence de méthode de prélèvement adéquat du sang capillaire. Il est en effet impossible de réaliser ce prélèvement à l'aide du matériel conventionnel (seringue et aiguille).

iii. Test utilisant l'hématocrite ou méthode de Schalm et Jain

Un prélèvement de sang total peut également être utilisé en le plaçant dans un tube à hématocrite et le centrifugeant. Les microfilaires en mouvement peuvent alors être observés au microscope dans la portion plasmatique à proximité du buffy coat. Cependant, un nombre

minimal de 50 à 100 microfilaries par millilitre de sang est nécessaire afin de détecter la microfilarémie (Ducos De Lahitte 1990; American Heartworm Society 2014).

iv. Test de Knott modifié

Les méthodes rapportant les meilleures sensibilité et spécificité sont le test de Knott modifié et le test de filtration sur membrane. La microfilarémie est détectée à partir d'une microfilarie par millilitre de sang.

Le test de Knott est la méthode de référence pour l'analyse morphologique et la mesure des dimensions des microfilaries. La sensibilité et la spécificité de ce test atteignent respectivement 85,71% et 91,66% (Ranjbar-Ba, Eslami, Bokaic 2007). Cependant, il ne permet pas de diagnostiquer la dirofilariose cardiopulmonaire sous sa forme occulte : environ 30% des chiens atteints de la dirofilariose sont amicrofilarémiques (ESCCAP France 2023).

Cet examen nécessite le prélèvement d'une plus grande quantité de sang (1 mL) afin d'augmenter la probabilité de découverte de microfilaries. Le protocole du test de Knott modifié se déroule de la façon suivante (Soares et al. 2022) :

- Ajout de 9 mL de formaldéhyde à 2% au prélèvement sanguin (1 mL de sang prélevé sur anticoagulant EDTA) dans un tube de Falcon
- Homogénéisation du mélange permettant l'hémolyse et la conservation des microfilaries en position étirée
- Centrifugation à 1500 rpm durant 5 minutes
- Élimination du surnageant et coloration du culot par ajout d'une goutte de bleu de méthylène à 0,1% puis homogénéisation
- Application d'une goutte de la solution colorée entre lame et lamelle et observation au microscope (objectif x10)

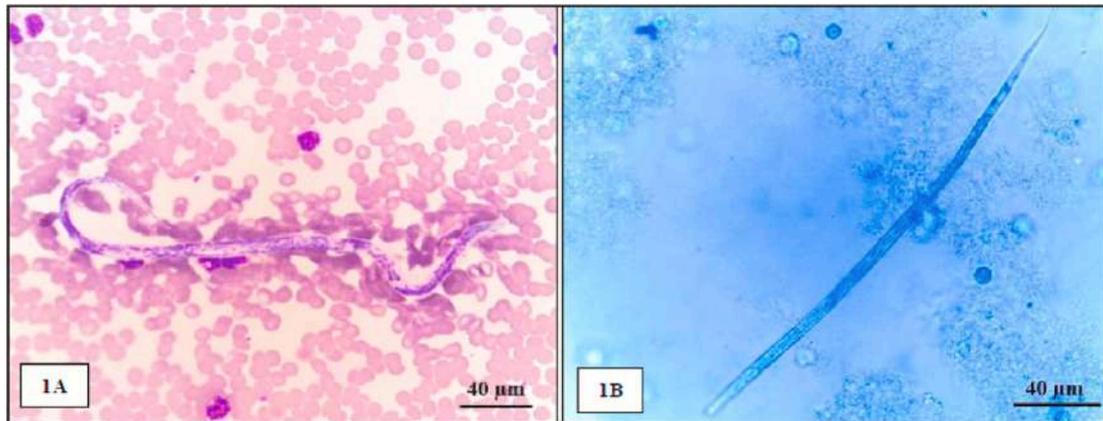


Figure 16 : A- Microfilaire de *D. immitis* observée au microscope dans un échantillon sanguin, colorée au RAL 5-5-5 (objectif x40). B- Microfilaire de *D. immitis* étendue sur une lame de test de Knott modifié, colorée au bleu de méthylène (objectif x40) (Soares et al. 2022)

v. Test de filtration sur membrane

C'est une méthode plus rapide à mettre en place que le test de Knott précédemment présenté. Cependant, la fixation des microfilaires ne permet pas une analyse morphologique et dimensionnelle comparable. C'est donc une bonne méthode diagnostique en termes de sensibilité mais peu efficace en termes de spécificité. Il existe des kits commerciaux contenant les filtres, les solutions de lyse et les colorants nécessaires. Cette méthode débute elle aussi par une étape de lyse des globules rouges. La solution hémolysée est placée au contact d'un filtre au travers duquel le manipulateur la pousse. Un rinçage du filtre est effectué afin d'éliminer les débris. Le filtre, ayant retenu les microfilaires, est ensuite placé sur une lame et coloré au bleu de méthylène à 0,1%, puis observé au microscope (objectif x10) (Ducos De Lahitte 1990).

vi. Intérêts et inconvénients des méthodes directes

Les méthodes de diagnostic direct de la dirofilariose cardiopulmonaire sont largement utilisées en pratique en raison de leur facilité de réalisation et de leur faible coût. Cependant, ces méthodes se heurtent à deux difficultés majeures :

- L'existence de faux négatifs. Les études estiment en effet entre 25 et 60% le pourcentage de chiens souffrant de dirofilariose occulte selon les auteurs, sans compter les variations individuelles, journalières et saisonnières pouvant perturber la microfilarémie.

- L'existence de faux positifs. De nombreuses filaires autres que celles de *D. immitis* sont sanguicoles. Il est donc nécessaire de procéder à une identification des microfilaires avant de poser le diagnostic d'infestation à *D. immitis*.

b. Identification des microfilaires

De nombreuses espèces de nématodes peuvent être retrouvées sous forme larvaire dans la circulation sanguine des chiens. Parmi celles-ci, on retrouve : *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Strongyloides stercoralis*, ... Les microfilaires sanguicoles les plus communément observées en Europe appartiennent aux genres *Dirofilaria* et *Acanthocheilonema* (anciennement *Dipetalonema*). Les principales espèces sont respectivement *D. immitis*, *D. repens*, et *Acanthocheilonema dracunculoides* et *A. reconditum*.

L'identification du genre et de l'espèce de microfilaire se base sur une observation microscopique de celle-ci lors de l'examen du prélèvement sanguin (principalement par test de Knott modifié) :

- Intensité de la microfilarémie (élevée pour le genre *Dirofilaria*, faible pour *Acanthocheilonema*),
- Mouvements des filaires (*D. immitis* ondulent alors qu'*A. reconditum* fait des mouvements vifs),
- Taille et morphologie (**Tableau 4**) (Ducos De Lahitte 1990; Bourdoiseau 2000).

Tableau 4 : Morphologie des principales espèces de filaires circulantes chez le chien (Bourdoiseau 2000; Otranto et al. 2013; Magnis et al. 2013; ESCCAP France 2023)

	<i>D. immitis</i>	<i>D. repens</i>	<i>A. reconditum</i>	<i>A. dracunculoides</i>
Longueur	290 - 330 µm	300 – 370 µm	260 – 283 µm	190 – 247 µm
Largeur	5 – 7 µm	6 – 8 µm	4 µm	4 – 6,5 µm
Enveloppe	Absente	Absente	Absente	Présente
Partie céphalique	Large, légèrement conique	Réduit, émoussée, subrectangulaire	Émoussée	Arrondie
Partie caudale	Droite avec extrémité effilée	Extrémité courbée en “hameçon”	Incurvée en “bouton-crochet”	Droite, pointue et longue

Cependant, en pratique, les méthodes de fixation influencent les mensurations du parasite. Ainsi, la confirmation de l'identification de l'espèce doit passer par la mesure de plusieurs individus ce qui est parfois difficilement réalisable. L'identification des espèces demeure une nécessité puisque leur pathogénie est différente (l'infestation à *A. reconditum* par exemple est asymptomatique) et aura une influence sur la mise en place du traitement (Engelmann et al. 2019).

Face à ces limites, des colorations histochimiques ont été développées en laboratoire. Elles recherchent les zones d'activité d'une enzyme : la phosphatase acide. Ces zones se manifestent par des aires de coloration rouge brique (**Figure 17**). Leurs positions permettent de distinguer les espèces de filaires. La coloration démontre :

- Chez *D. immitis*, deux zones d'activité phosphatasique acide au niveau du pore excréteur et du pore anal,
- Chez *D. repens*, une seule zone d'activité phosphatasique acide au niveau du pore anal,
- Chez *A. reconditum*, l'activité phosphatasique acide colore l'ensemble du corps,
- Chez *A. dracunculoides*, trois zones d'activité phosphatasique acide localisées au niveau du pore excréteur et du pore anal (Bourdoiseau, 2000) (Ducos Lahitte 1990).

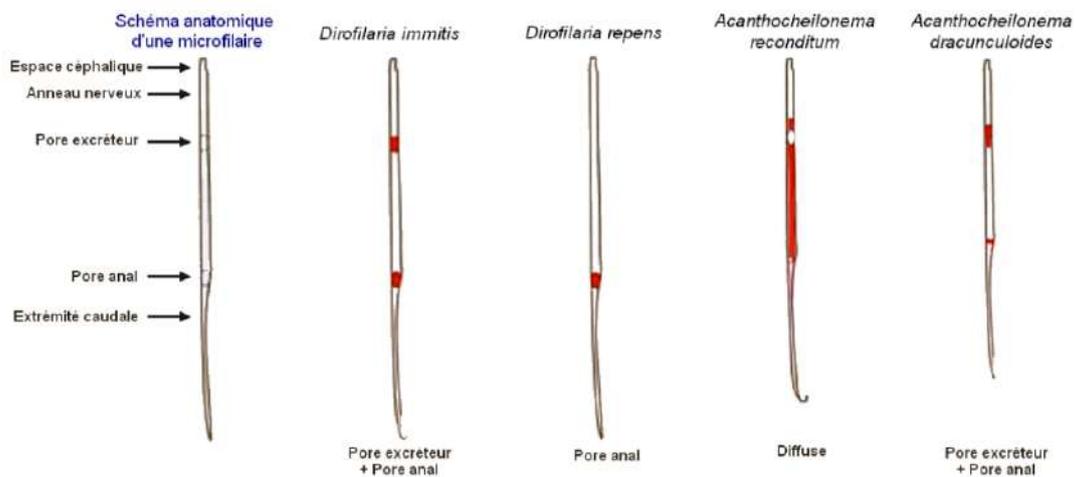


Figure 17 : Représentation schématique des zones d'activité phosphatasique acide chez quatre espèces de microfilaires (Schrey, Trautvetter 1998)

3. Détection d'antigènes de *Dirofilaria immitis*

Les méthodes indirectes de diagnostic de la dirofilariose cardiopulmonaire chez le chien sont fondées sur la mise en évidence des antigènes. Les méthodes fondées sur la mise en évidence

des anticorps ont été abandonnées précédemment pour défaut de spécificité (Bourdoiseau 2000).

a. Principe des tests sérologiques

L'objectif des tests sérologiques est la détection des antigènes solubles circulant excrétés par les femelles adultes de *D. immitis* dans le sang. La glycoprotéine recherchée est secrétée via le tractus génital des individus femelles dès 5 à 7 mois après l'infestation. Ce sont des tests faciles d'accès, peu coûteux et rapides, disposant d'une sensibilité comprise entre 93 et 100% (Ranjbar-Ba, Eslami, Bokaic 2007). Leur seuil de détection varie entre 1 à 5 femelles adultes. Ils permettent également de mettre en évidence les filarioses occultes pour lesquelles la recherche de microfilaires se serait révélée infructueuse.

Deux méthodes sont disponibles en médecine vétérinaire : la technique immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) et l'immunochromatographie (Semat 2016).

i. Méthode ELISA "Sandwich"

La technique immuno-enzymatique permet une détection qualitative et semi-quantitative des antigènes parasitaires de *D. immitis*. Cependant, la quantité d'antigènes étant uniquement corrélée au nombre de vers femelles adultes, il est déconseillé de tirer de ce test une appréciation de la sévérité de l'infestation parasitaire.

Un conjugué d'anticorps, dirigés contre les antigènes recherchés et marqués par une enzyme, est ajouté à l'échantillon (sang total, plasma ou sérum). Les antigènes, s'ils sont présents, vont se lier aux anticorps marqués. Le mélange est ensuite placé à l'intérieur d'un puits. Il migre sur une membrane recouverte d'anticorps spécifiques de la glycoprotéine recherchée (antigène parasite secrétée par une femelle adulte). La migration s'effectue d'abord dans un sens, puis, lors de l'activation du dispositif et de la libération des réactifs, dans l'autre sens. La membrane est ensuite lavée afin d'éliminer les éléments non liés qui pourraient interférer avec le résultat. Pour finir, une solution de substrat incolore parcourt la plaque. Cette solution se colore en bleu lorsqu'elle est mise en contact avec l'enzyme (**Figure 18**). La coloration bleue met en évidence la présence de l'antigène parasite recherché dans l'échantillon (Semat 2016; Dauphin 2018).

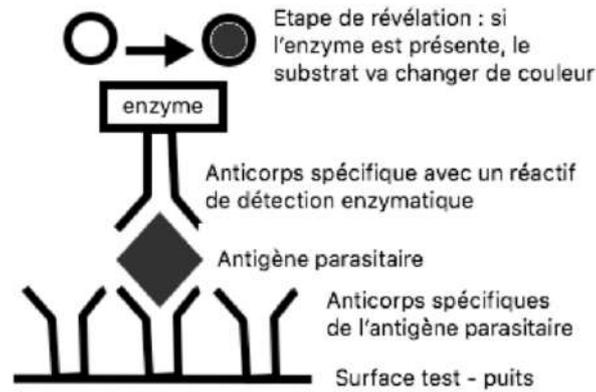


Figure 18 : Principe de détection des antigènes parasitaires par la méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Zajac, Conboy 2012)

ii. Méthode de l'immunochromatographie

La recherche d'antigènes parasitaires par immunochromatographie passe par différentes étapes:

- Les anticorps spécifiques de l'antigène parasitaire sont fixés sur une zone du support de migration appelée "ligne de capture"
- Les anticorps anti-immunoglobulines sont fixés sur une seconde zone du support appelée "ligne de contrôle"

Le prélèvement (sang total, sérum, plasma) est placé sur le support. Des billes d'or colloïdal (ou de latex colorées) fixées à des anticorps spécifiques sont ajoutées. Si le prélèvement présente les antigènes recherchés, les billes colorées vont alors s'y fixer. Cet ensemble migre vers l'autre extrémité du support, passant successivement sur la ligne de capture et la ligne de contrôle. Si l'antigène est présent dans l'échantillon, il se fixe aux anticorps spécifiques de la ligne de capture. Il est alors "attaché" à ceux-ci mais également aux anticorps liés aux billes colorées : une coloration apparaît au niveau de la ligne de capture (**Figure 19**). Dans tous les cas, lorsqu'ils traversent la ligne de contrôle, les anticorps anti-immunoglobulines fixent les anticorps colorés et arrêtent la progression des complexes antigènes-anticorps (Semat 2016; Dauphin 2018).

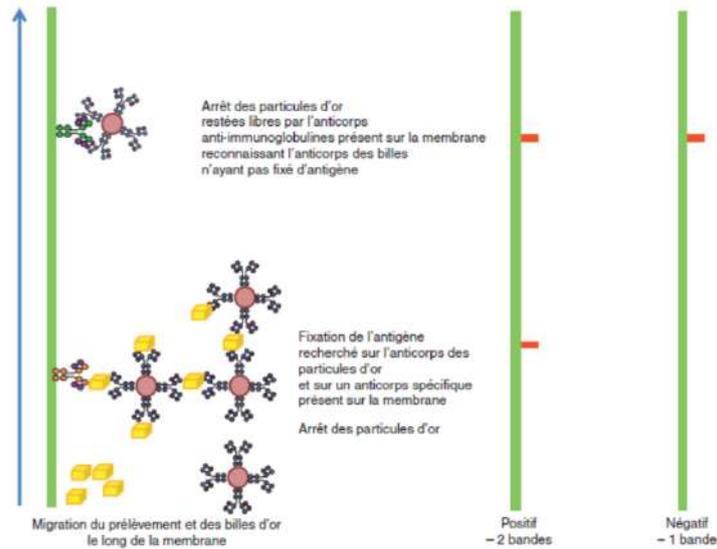


Figure 19 : Représentation schématique de l'immunochromatographie sur membrane (Béné et al. 2014)

b. Différents tests sérologiques disponibles

Seize tests sérologiques permettant la détection des antigènes de *D. immitis* sont disponibles sur le marché mondial. Parmi ceux-ci, quatre sont des tests utilisant la méthode ELISA, le reste utilisant l'immunochromatographie.

Les tests ELISA, mis sur le marché par les laboratoires ZOETIS et IDEXX, ont montré des sensibilités et des spécificités importantes. Elles sont respectivement supérieures ou égales à 97% et 100% à l'exception du SNAP Dirofilaria® d'IDEXX, atteignant une sensibilité de 84% (Dauphin 2018). Les données fabriquant indiquent des valeurs de sensibilité et spécificité de 98% et 100%, mais ces données sont grandement influencées par la pression parasitaire dans la population testée. Ce snap-test est le seul à permettre une évaluation semi-quantitative de la charge antigénique. Ainsi, lorsque le test est positif, deux marqueurs peuvent se colorer. L'un démontre une charge antigénique haute et le second une charge antigénique faible. Parmi les tests restants, on retrouve également le SNAP 4DX® du laboratoire IDEXX. Il permet, grâce à un unique snap-test, de détecter à la fois la présence d'antigènes de *D. immitis*, mais également d'anticorps spécifiques à certaines espèces d'*Ehrlichia*, d'*Anaplasma* et de *Borrelia*.

La grande majorité des snap tests commercialisés utilisent donc la technique de l'immunochromatographie. Ceux commercialisés en France le sont principalement par de grands laboratoires tels que VIRBAC (SpeedDiro®), KITVIA (Dirofilariose canine®) et

ZOETIS (Witness *Dirofilaria*[®]). Chacun de ces tests montrent une sensibilité et une spécificité respectivement comprises entre 94% - 100% et 98% - 100% (Dauphin 2018).

Une étude rapporte l'utilisation de la méthode ELISA à l'aide d'un antigène transcrit à la fois par les mâles et les femelles adultes de *D. immitis* (Solgi et al. 2018). Cette méthode permet un diagnostic de la dirofilariose au cours de la période prépatente et limite le nombre de réactions croisées avec les principales espèces de nématodes. Cependant, la technique présente une sensibilité acceptable de 92,5% mais une spécificité bien en deca des autres snap-test actuels (87,5%) comparativement à l'analyse PCR ayant servi de Gold Standard. Dans le futur, il sera éventuellement intéressant de combiner l'utilisation des deux antigènes parasites au cours de la réalisation des tests rapides.

c. Intérêts et inconvénients des tests sérologiques

Les tests sérologiques commercialisés peuvent avoir des valeurs prédictives positives variables notamment en fonction de la pression parasitaire du milieu de vie de l'animal testé.

i. Avantages

Ces méthodes de diagnostic indirect sont très utiles pour confirmer une hypothèse diagnostique notamment en raison des points indiqués ci-après (Guillot 2008; Semat 2016) :

- Facilité d'accès et d'utilisation, temps de réalisation court ;
- Bonnes sensibilité et spécificité (> 94% et proche de 100%) car fondées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes de *D. immitis* ;
- Mise en évidence des filarioses occultes ;
- Suivi de l'animal au cours du traitement : une négativité du test doit être atteinte dans les 6 mois qui suivent la mise en place du traitement adulticide ;
- Méthode semi-quantitative du SNAP *Dirofilaria*[®] permettant d'apprécier la charge antigénique.

Ce sont des méthodes faciles d'exécution, rapides, spécifiques, pouvant être réalisées dans le cadre d'une consultation vétérinaire.

ii. Inconvénients

Toutefois, la sensibilité et la spécificité de ces tests sont parfois insuffisantes (Castric 2002; Guillot 2008; American Heartworm Society 2014; Semat 2016) :

- Existence de faux négatifs :
 - Durant la période prépatente, c'est-à-dire dans les 5 à 7 mois suivant la primo-infestation (avant la libération des antigènes par les femelles adultes).
 - Lors de charges parasitaires faibles : le nombre de femelles adultes est inférieur au seuil de détection.
 - Lors d'infestation unisexe : il n'y a que des individus mâles en présence. Les antigènes étant sécrétés par le tractus génital des femelles, aucun antigène n'est détecté par le test.
 - Par destruction des antigènes recherchés ou liaison à des anticorps formant des complexes immuns (correspondant à environ 7% des cas) (Velasquez et al. 2014; DiGangi et al. 2017). Des faux-négatifs peuvent apparaître lorsque les individus ont reçu un traitement préventif à base de lactones macrocycliques (Drake et al. 2015; DiGangi et al. 2017). De nombreuses études ont également démontré l'intérêt des méthodes de dénaturation (par la chaleur, l'utilisation de pepsine, d'acide) des anticorps afin d'améliorer la sensibilité des tests sérologiques (Velasquez et al. 2014; DiGangi et al. 2017; Venco et al. 2017; Gruntmeir et al. 2023).
- Existence de faux positifs
 - Ces dernières années, de nombreuses études ont démontré la possibilité de réactions croisées avec les antigènes d'*Angiostrongylus vasorum*, *Spirocera lupi*, et *Dirofilaria repens*. Les études montrent donc l'importance de combiner les méthodes diagnostiques afin d'assurer un diagnostic précis et la mise en place d'un traitement adapté (Schnyder, Deplazes 2012; Aroch et al. 2015; Venco et al. 2017).

4. Méthodes de diagnostic moléculaire

À l'heure actuelle, les recommandations officielles de l'American Heartworm Society (AHS) pour le diagnostic de la dirofilariose cardiopulmonaire dans les régions endémiques sont d'effectuer un test sérologique rapide associé à un test de concentration sanguine. Cependant, d'autres techniques peuvent être utilisées. Bien que non disponibles en routine en clientèle, les

méthodes de diagnostic moléculaire se basent sur une PCR (Polymerase Chain Reaction) classique ou quantitative. Elle consiste en la recherche du matériel génétique des filaires.

Depuis le début du XXI^e siècle, de nombreuses études ont permis d'établir des protocoles fiables. Ainsi, la PCR est un outil et un atout majeur dans le diagnostic de la dirofilariose à *D. immitis*.

- En effet, plusieurs snap-tests ont montré des réactions croisées entre différentes espèces. L'efficacité de la PCR pour la discrimination des genres parasites au cours de la démarche diagnostique a été prouvée (Rishniw et al. 2006).
- En 2012, une équipe propose un protocole de PCR multiplex pour rechercher et différencier les filaires de *D. immitis* et *D. repens* (Latrofa et al. 2012).
- Depuis 2020, de nombreuses études tentent d'améliorer encore les performances de la PCR, en proposant notamment de combiner la détection du matériel génétique des filaires avec celui de la bactérie symbiotique : *W. pipientis* (Laidoudi et al. 2020). Certaines études s'intéressent également à l'utilisation des méthodes moléculaires en remplacement des méthodes de concentration sanguine (Lane et al. 2021; Negron et al. 2022). Cependant, la difficulté d'accès à ces protocoles reste un frein à leur réalisation en pratique courante.

Toutes les études s'accordent cependant sur l'importance de la sensibilité et de la spécificité de ces méthodes chez les individus microfilarémiques.

5. Spécificités du diagnostic de la dirofilariose en Nouvelle-Calédonie

Le diagnostic de la dirofilariose cardiopulmonaire chez le chien est un acte réalisé en routine par le vétérinaire praticien. Il est effectué dans le cadre du dépistage avant chimioprophylaxie ou bien suite à l'observation de signes cliniques compatibles avec la maladie. Trois méthodes diagnostiques sont utilisées en routine :

- La réalisation d'un test sérologique (sous la forme d'un snap-test) uniquement ;
- La réalisation de l'examen direct d'une goutte de sang au microscope uniquement ;
- La réalisation d'un test sérologique (sous la forme d'un snap-test) combiné à l'examen direct d'une goutte de sang au microscope.

L'association de la détection des antigènes parasites avec celles des microfilaires est recommandée par l'AHS. Elle permet de s'affranchir de nombreux cas de faux négatifs. Malheureusement, moins de 40% des vétérinaires calédoniens réalisent systématiquement les deux tests. Pour 37,5% des praticiens, le diagnostic ne repose que sur le test rapide, mettant en

évidence uniquement les antigènes parasitaires. Concernant les vétérinaires restants, ils réalisent parfois les deux tests ou bien un seul des deux. Leur choix se fait majoritairement pour des raisons économiques. Si les signes cliniques observables chez l'animal sont compatibles avec la dirofilariose et que l'examen de la goutte de sang montre des microfilaries, le vétérinaire peut être amené à s'affranchir du test rapide. De la même façon, certains clients ne souhaitent réaliser qu'un seul test pour des raisons économiques. Le praticien doit donc parfois se contenter de la lecture de lame (**Annexe 7**).

Par ailleurs, le diagnostic par biologie moléculaire n'est pas disponible en routine chez le chien sur le territoire, réduisant ainsi les options pour le praticien.

VII. Traitement et prévention

1. Prophylaxie de la dirofilariose cardiopulmonaire

a. Mesures chimiques de protection contre les moustiques

La prévention de la dirofilariose cardiopulmonaire passe en premier lieu par la prévention contre la piqûre des moustiques, se faisant essentiellement par l'administration régulière de répulsifs à base de pyréthrinoïdes. Chez le chien, les deux principales molécules disposant d'une AMM contre les piqûres de moustiques sont la perméthrine, généralement disponible sous forme de pipette, et la deltaméthrine, sous forme de collier.

Les principales spécialités vétérinaires disposant d'une AMM chez le chien en France avec l'indication "action répulsive contre les moustiques" sont répertoriées dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Principales spécialités vétérinaires disposant d'une AMM chez le chien avec l'indication « action répulsive contre les moustiques »

Principes actifs	Spécialité	Indication
Imidaclopride + Perméthrine	Advantix Spot-On®	Assure une activité répulsive contre les moustiques pendant deux (<i>Aedes aegypti</i>) à quatre semaines (<i>Culex pipiens</i>)
Dinotéfurane + Pyriproxifène + Perméthrine	Vectra 3D Spot-On®	Empêche les piqûres et possède une activité insecticide persistante pendant un mois vis-à-vis des moustiques
Fipronil + Perméthrine	Effitix Spot-On®	Assure une activité répulsive contre les moustiques pendant quatre semaines
Fipronil + Perméthrine	Frontline Tri-Act Spot-On®	Possède une efficacité répulsive pendant quatre semaines contre les moustiques (<i>Culex pipiens</i> , <i>Aedes albopictus</i>) associée à une efficacité insecticide rémanente de trois semaines (<i>Aedes albopictus</i>)
Deltaméthrine	Scalibor Collier®	Possède un effet répulsif contre les moustiques (<i>Culex pipiens pipiens</i>) persistante pendant 6 mois

b. Mesures de chimioprévention

i. Protocoles

La chimioprévention de la dirofilariose à *D. immitis* a pour but d'éliminer les stades larvaires du parasite (L3-L4) avant qu'ils ne puissent devenir des adultes et s'installer dans le cœur et les artères pulmonaires.

La chimioprophylaxie médicale de la dirofilariose cardiopulmonaire chez les chiens repose sur une administration régulière (mensuelle, semestrielle ou annuelle) de lactones macrocycliques (ivermectine, moxidectine, sélamectine, milbémycine oxime) par voie orale, transcutanée ou parentérale. Les molécules de la famille des lactones macrocycliques possèdent une action avérée sur les larves de stade L3 et L4. De plus, lors d'utilisation prolongée, une action sur les microfilaires et les vers adultes a pu être démontrée (Bowman, Mannella 2011). Toutefois, les effets adulticide et microfilaricide n'ont que rarement été rapportés dans les autorisations de mise sur le marché (AMM) aux doses usuellement recommandées. Ainsi, concernant les

traitements par voie parentérale, une diminution de la charge en microfilaires peut être observée sans que l'AMM garantissent une élimination complète.

Les posologies standards assurent une innocuité d'utilisation chez toutes les races, y compris chez les individus présentant une mutation du gène MDR1 (American Heartworm Society 2014). De rares réactions ont pu être observées lors d'administration de lactones macrocycliques chez des individus présentant une microfilarémie importante.

Selon les recommandations de l'AHS, en zone d'endémie de la dirofilariose, toute mesure de chimioprévention doit être accompagnée de la réalisation de tests de dépistage chez les chiens.

Ainsi, il est fortement conseillé :

- Chez les chiots pour lesquels la chimioprophylaxie a été mise en place avant l'âge de 6 mois, de réaliser un test de dépistage dans les 6 mois suivant la première administration du traitement ;
- Chez les individus n'ayant reçu aucune chimioprophylaxie et ayant 7 mois ou plus, de réaliser un test de dépistage avant toute mise en place d'un traitement.

La prophylaxie peut également être réalisée de manière saisonnière. L'administration de lactones macrocycliques doit alors précéder d'un mois le début de la période de transmission de *D. immitis* (variable selon les zones géographiques). Elle devrait être poursuivie jusqu'à six mois après la fin de cette période. Actuellement, il demeure recommandé de traiter les animaux à risque tout au long de l'année en zone d'endémie.

ii. Spécialités

De nombreuses spécialités disposent d'une AMM française concernant la prévention de la dirofilariose à *D. immitis* chez le chien et sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 6 : Spécialités vétérinaires disposant d'une AMM en France pour la prévention de la dirofilariose à *Dirofilaria immitis* chez le chien

Molécule	Spécialité	Voie d'administration	Posologie	Fréquence d'administration
Sélamectine	Stronghold [®] Selames [®] Evicto [®]	Spot-On	6 mg/kg	Mensuelle
Milbémycine oxime	Nexgard Spectra [®] Interceptor [®] Milbemax [®] Milbactor [®] Milpro [®]	Voie orale	0,5 – 1,07 mg/kg 0,5 – 1 mg/kg > 0,5 mg/kg	Mensuelle
Moxidectine	Advocate [®] Simparica Trio [®]	Spot-on Voie orale	2,5 – 6,25 mg/kg 0,024 – 0,048 mg/kg	Mensuelle
Moxidectine longue action	Guardian SR Injectable [®] Afilaria SR [®]	Voie sous-cutanée	0,17 mg/kg	Bi-annuelle (à 6 mois d'intervalle)

iii. Résistances aux lactones macrocycliques

La résistance d'un parasite vis-à-vis d'une molécule anthelminthique est définie comme étant la capacité du parasite à se multiplier ou à survivre en présence d'une concentration en anthelminthique qui normalement détruit ou prévient la multiplication des individus de la même espèce.

Depuis de nombreuses années, des phénomènes de résistance des filaires à l'administration de lactones macrocycliques sont rapportés de façon sporadique. Ces échecs thérapeutiques ont été évoqués pour la première fois aux États-Unis, en 2005 (Hampshire 2005). Dans ce papier, l'auteur synthétise de nombreux cas d'échec aux traitements aux lactones macrocycliques enregistrés par la Food and Drug Administration (FDA) entre 1998 et 2003, ayant été initialement attribués à un défaut d'observance. Les raisons mais également l'étendue et le degré de la diffusion de cette résistance restent actuellement sujets à controverse. Cependant, ces phénomènes concernent l'ensemble des molécules de la famille des lactones macrocycliques utilisées dans la prévention de la dirofilariose à *D. immitis*. Les taux d'échec

au traitement varient selon la souche parasitaire, mais également selon le principe actif utilisé, sa dose et la formulation du produit.

L'utilisation d'un produit antiparasitaire quel qu'il soit, en dehors des conditions indiquées favorise la sélection génétique des allèles responsables de la résistance. Par exemple, l'utilisation des lactones macrocycliques en monothérapie chez les individus microfilarémiques ne permet pas une mort rapide des individus (microfilarémie encore détectable après 12 mois de traitement d'après Bowman, Mannella en 2011). Elle participe ainsi à la sélection de microfilaires résistantes. Ces individus une fois adultes pourront également transmettre leurs allèles de résistance. Cette situation démontre l'importance du dépistage pré-traitement de la maladie.

c. Spécificités de la prophylaxie en Nouvelle-Calédonie

i. Mesures de protection contre les moustiques

De nombreuses maladies vectorielles, zoonotiques ou non, sont présentes en Nouvelle-Calédonie. Depuis des années, le territoire lutte contre les moustiques par la destruction des gîtes larvaires et la mise en place de mesures de lutte chimique (insecticides, répulsifs, ...). Cependant, ces méthodes ont démontré leurs limites avec l'apparition notamment de résistances et la difficulté de destruction des gîtes larvaires en raison de leur grand nombre.

Récemment, Scott O'Neill, en sa qualité de directeur du World Mosquito Program, et ses équipes ont démontré la capacité de la bactérie *W. pipientis*, lorsqu'elle est en symbiose avec *A. aegypti*, à restreindre la transmission des virus de la dengue, du zika, du chikungunya et de la fièvre jaune. Depuis 2019, une action consistant en des lâchers de moustiques *A. aegypti* porteurs de la bactérie symbiotique *Wolbachia* a été mise en œuvre à l'échelle du pays afin de remplacer les populations sauvages par des moustiques avec un capacité vectorielle réduite concernant les virus cités précédemment, mais augmentée concernant *D. immitis* (CALEDONIA 2022).

ii. Mesures de chimioprévention

La prophylaxie médicale de la dirofilariose canine représente une part importante de la médecine préventive vétérinaire néo-calédonienne. La proximité géographique de la Nouvelle-Calédonie et des pays du Common Wealth (Australie) permet aux vétérinaires praticiens

d'obtenir d'autres spécialités disposant d'une autorisation administrative d'importation (AAI) via les centrales d'achat vétérinaires (**Tableau 7**).

*Tableau 7 : Spécialités vétérinaires disposant d'une autorisation administrative d'importation, utilisée pour la prévention de la dirofilariose à *D. immitis* en Nouvelle-Calédonie*

Molécule	Spécialité	Voie d'administration	Posologie	Fréquence
Ivermectine	NuHeart® Heartgard®	Voie orale	6 à 12 µg/kg	Mensuelle
Moxidectine longue action	ProHeart 6® ProHeart 12®	Voie sous-cutanée	0,17 mg/kg	Semestrielle Annuelle

Certains vétérinaires utilisent également des spécialités vétérinaires hors AMM. On peut citer à titre d'exemple l'Ivomec®, le Cevamec® et l'Oramec® utilisés habituellement chez les ruminants respectivement par voie injectable et par voie orale. Ces spécialités sont à administration mensuelle chez le chien dans le cadre de la prévention de la dirofilariose.

L'utilisation de molécule à longue durée d'action est cependant préférée par plus de 87% des vétérinaires. La moxidectine longue action (ProHeart 12®) est grandement utilisée par les vétérinaires calédoniens (62,5% la recommandent préférentiellement). Elle permet d'améliorer l'observance des mesures prophylactiques. L'administration de la molécule peut être groupée avec la vaccination annuelle. Les praticiens préconisent également fréquemment l'administration semestrielle de moxidectine longue action (Guardian® ou ProHeart 6®). Dans 12,5% des structures, il arrive qu'une unique administration annuelle de moxidectine à durée d'action semestrielle soit réalisée par le vétérinaire traitant (**Annexe 7**).

2. Traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire

L'objectif du traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire est l'amélioration de l'état clinique de l'animal par élimination du parasite à tous les stades de son développement. L'administration n'est cependant pas anodine. De nombreuses complications peuvent survenir selon l'état d'infestation de l'animal et les lésions associées. Une stabilisation de l'état clinique du patient sera, dans certains cas, nécessaire avant de traiter l'infestation parasitaire (American Heartworm Society 2014).

a. Traitement médical

La mise en place de tout traitement médical doit être précédée par un état des lieux de l'anamnèse de l'animal (incluant son niveau d'activité physique) ainsi que l'évaluation minutieuse de son état clinique et de son statut vis-à-vis de la pathologie (test de concentration sanguine et/ou test sérologique). L'ensemble des examens complémentaires effectués au cours de la consultation devront permettre une estimation de la charge parasitaire et de la gravité des lésions associées à la présence des parasites. La radiographie et l'échocardiographie constituent des examens de choix quant à la mise en évidence des lésions cardiopulmonaires et l'évaluation du risque de thromboembolie. Cependant, bien que nécessaires, ces deux examens d'imagerie ne permettent pas d'estimer avec certitude la quantité de vers adultes en présence et donc de prévoir avec justesse les complications ultérieures au traitement.

La réalisation d'un bilan biochimique afin d'évaluer les fonctions hépatique et rénale est recommandée. Le résultat peut orienter le clinicien vers la mise en place de mesures de réanimation et de stabilisation avant tout traitement anthelminthique.

Dans tous les cas, la mise en place du traitement de la dirofilariose à *D. immitis* doit être précédée d'une évaluation de la balance bénéfices-risques en accord avec l'examen de l'animal et les capacités financières et techniques du propriétaire (American Heartworm Society 2014).

i. Thérapie adulticide

Le seul médicament adulticide approuvé par la FDA et disposant d'une AMM pour la dirofilariose cardiopulmonaire canine est la mélarsomine. Commercialisée sous le nom d'Immiticide[®], elle s'administre par voie intramusculaire profonde dans les muscles lombaires (entre la 3^{ème} et la 5^{ème} vertèbre lombaire).

Il existe deux protocoles d'administration. Chaque protocole est validé par l'American Heartworm Society. Il s'agit d'un groupe d'experts en parasitologie vétérinaire ayant pour objectif de faire progresser les connaissances concernant la dirofilariose cardiopulmonaire. L'AHS guide également les vétérinaires dans la prise en charge de cette pathologie. Pour cela, les experts de ce groupe se réunissent tous les trois ans au cours d'un symposium à l'issue duquel sont publiées ou mises à jour des « *guidelines* ». Ces *guidelines* sont reconnues internationalement pour le diagnostic, la chimioprévention et le traitement de la dirofilariose

cardiopulmonaire. Elles définissent ainsi précisément les protocoles recommandés et leurs conditions de mise en place :

- Chez les individus de classe I à II, le protocole consiste en deux injections à 2,5 mg/kg de mélarsomine à 24h d'intervalle. Il permet l'élimination de 90% des vers adultes d'après l'AHS.
- Chez les individus de classe III, le protocole consiste en une injection à 2,5 mg/kg suivie de deux injections à 2,5 mg/kg un mois plus tard, réalisées à 24h d'intervalle. Il tue 98% des vers adultes selon l'AHS.

Actuellement, le protocole en trois doses est recommandé par l'AHS pour sa sécurité d'utilisation et son efficacité. L'administration s'accompagne d'un repos strict et obligatoire pendant 4 à 6 semaines. L'objectif est de limiter le risque de thrombo-embolie parasitaire pouvant survenir dans les 7-10 jours à 4 semaines après l'injection (Beugnet, Halos, Guillot 2018; Zhang 2022).

Effets indésirables de la mélarsomine

- Une réaction de douleur accompagnée d'œdème (dans un tiers des cas) et pouvant entraîner une gêne locomotrice peut apparaître au site d'injection de la mélarsomine. Ces signes disparaissent en quelques jours à 2 à 4 semaines. Dans de rares cas, un séroma stérile peut apparaître au site d'injection (**Figure 20**).
- Des symptômes digestifs tels que diarrhée, vomissements et hypersalivation accompagnés ou non d'une anorexie peuvent survenir. L'administration de mélarsomine peut également mener à une élévation des enzymes de cytolysé hépatique sans conséquence sur la fonction hépatique.
- Des thromboembolies parasitaires peuvent survenir dans les jours suivant l'injection et jusqu'à 4 à 6 semaines après le traitement adulticide. L'animal atteint peut alors présenter : de la toux, de l'abattement, une anorexie, une tachypnée et/ou une dyspnée, de l'hémoptysie, de la fièvre voire des syncopes. La majorité des épisodes de thromboembolie surviennent chez des animaux présentant une dirofilariose cardiopulmonaire de classe III. Le respect d'un repos strict est ainsi primordial puisqu'il évite une augmentation brutale du débit sanguin au sein des artères pulmonaires.
- Le traitement adulticide peut également être à l'origine d'un choc anaphylactique issu de la libération massive d'antigènes parasitaires dans la circulation sanguine. Les signes cliniques apparaissent dans la semaine suivant le traitement (anorexie, abattement, dépression) (Semat 2016). Le recours à une corticothérapie permet de contrôler les

signes cliniques liés à la destruction massive des parasites adultes. De plus, ils n'entraînent pas de baisse d'efficacité de la mélarsomine lorsqu'ils sont utilisés en bithérapie (Dzimianski, McCall, Mansour 2010). L'AHS recommande actuellement la mise en place d'une bithérapie dans les zones d'endémie par administration de prednisolone.

- De manière anecdotique, d'autres types d'effets secondaires ont pu être observés au cours des essais cliniques ou ont été rapportés par les études de pharmacovigilance. Dans une étude de 2003, Hettlich et al. décrivent trois cas de chiens ayant présenté des troubles neurologiques à la suite de l'injection de mélarsomine. En 2023, un cas de coagulation intravasculaire disséminée consécutif à l'injection intramusculaire est documenté (Philp, Farrell, Li 2023).

Prevalence of Clinical Observation/Adverse Reactions Reported in Clinical Field Trials		
Clinical Observation/ Adverse Reaction	Melarsomine dihydrochloride % of dogs n=311	PLACEBO % of dogs n=63
Injection Site Reactions	32.8	3.2
Coughing/Gagging	22.2	14.3
Depression/Lethargy	15.4	4.8
Anorexia/Inappetence	13.2	3.2
Pyrexia (fever)	7.4	0.0
Lung Congestion/Sounds	5.5	1.6
Emesis	5.1	1.6
Diarrhea	2.6	0.0
Dyspnea	2.6	1.6
Hypersalivation	1.9	0.0
Panting	1.6	0.0
Hemoptysis	1.6	0.0

Clinical observations/adverse reactions occurring in less than 1.5% of the dogs treated with melarsomine dihydrochloride include: abdominal hemorrhage, abdominal pain, bloody stool/diarrhea, colitis, gingivitis, pancreatitis, anemia, DIC, hemoglobinemia, icterus (mucous membranes), discolored urine, hematuria, inappropriate urination, low specific gravity, polyuria, pyuria, bronchitis, miscellaneous respiratory problem, pneumonia, tachypnea, tracheobronchitis, wheezing, alopecia, hair color and coat character change, miscellaneous skin problem, ataxia, disorientation, fatigue/tires easily, miscellaneous eye problem, weight loss, convulsion/seizure, leukocytosis, polydipsia, and restlessness.

Figure 20 : *Prévalence des différents effets secondaires rencontrés chez les chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire, traités avec de la mélarsomine par administration par voie intramusculaire issu de la notice technique du Diroban® (ZOETIS)*

Average Onset Time and Duration (with Ranges) of the Most Common Reactions in Clinical Trials

Clinical Observation/ Adverse Reaction	Avg. Onset Time in Days (range)*	Avg. Duration in Days (range)*
Injection Site		
Swelling/Edema/Seroma Pain/Discomfort/ Irritation/Inflammation/Heat	6 (0*-77)	18 (< 1-210)
Generalized/Local Myalgia with Tenderness and Stiffness	1 (0-6)	3 (< 1-30)
Persistent (lumps, knots, nodules, masses)	3 (1-8)	9 (< 1-30)
Abscess (sterile and septic)	22 (0-99)	47 (1-152)
	24 (10-42)	21 (5-36)
Coughing/Gagging	10 (0-103)	13 (< 1-134)
Depression/Lethargy	5 (0-46)	6 (< 1-48)
Anorexia/Inappetence	5 (0-63)	5 (< 1-30)

*A zero indicates that the reaction first occurred on the day of treatment.

Figure 21 : Moyenne de délai d'apparition et de durée des effets secondaires consécutifs à l'administration de mélarsomine chez des chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire, issu de la notice technique du *Diroban*[®] (ZOETIS), non commercialisé en France

Mortality in Dogs with Class 1, 2, and 3 Heartworm Disease Treated with melsarsomine dihydrochloride in Clinical Field Trials	CLASS 1, 2	CLASS 3
	% OF DOGS n=267	% OF DOGS n=44
Total Deaths	5.2	18.2
Cause:		
Trauma	2.3	2.3
Thromboembolism	0.0	4.6
Euthanasia (unrelated to treatment or underlying disease)	1.1	0.0
Euthanasia (related to treatment or underlying disease)	0.0	2.3
Underlying Disease	0.8	2.3
Undetermined	1.1	6.8

Figure 22 : Mortalités comparées selon la cause du décès de l'animal en fonction du stade de la dirofilariose cardiopulmonaire évalué au moment du traitement à la suite de l'administration de mélarsomine chez des chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire, issu de la notice technique du *Diroban*[®] (ZOETIS), non commercialisé en France

Toutes les études s'accordent cependant sur une contre-indication stricte de l'utilisation de la mélarsomine chez les chiens atteints de dirofilariose cardiopulmonaire de classe IV ou syndrome de la veine cave.

Malgré le traitement adulticide, les lésions cardiovasculaires à l'origine de l'hypertension pulmonaire ne sont bien souvent que partiellement réversibles. L'amélioration lésionnelle peut prendre plusieurs mois du fait de la persistance des antigènes parasitaires (Serrano-Parreño et al. 2017).

ii. Thérapie microfilaricide

La thérapie médicamenteuse de la microfilarémie consiste en l'administration de molécules de la famille des lactones macrocycliques (ivermectine, moxidectine, sélamectine et milbémycine oxime). Chacune présente une action microfilaricide, cependant elles sont non équivalentes en termes d'efficacité. Le mécanisme d'action des lactones macrocycliques n'est pour l'heure pas totalement élucidé. Il semblerait qu'elles disposent d'une action directe sur le système nerveux du parasite, affectant l'ensemble des stades pouvant se retrouver au sein de l'utérus d'un individu femelle (Bowman, Mannella 2011).

Seule la moxidectine appliquée en topique est approuvée par la FDA comme microfilaricide dans le cadre du traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire (American Heartworm Society 2014). En effet, il s'agit de la seule lactone macrocyclique ayant démontré son innocuité d'utilisation même dans le cadre de microfilarémie importante. Il s'agit donc de la seule spécialité disposant d'une AMM en France concernant l'élimination des microfilaires de *D. immitis*.

La réduction de la microfilarémie peut nécessiter de nombreux mois de traitement, et malgré cela, certains individus ne retrouvent jamais un statut amicrofilarémique. Il est estimé qu'environ 10 à 20% des chiens traités uniquement par administration de lactones macrocycliques mensuellement pendant 12 mois vont présenter une microfilarémie persistante (Bowman, Mannella 2011).

Malgré cela, les lactones macrocycliques sont régulièrement utilisées pour leurs effets microfilaricide et adulticide lent. En effet, en administrations mensuelles, elles permettent une réduction de la charge parasitaire tout en limitant la survenue d'effets indésirables. Ce protocole dit "de mort lente" est largement utilisé lorsque le traitement à base de mélarsomine est contre indiqué ou non réalisable par défaut de moyens notamment. Une mort 71% effective des adultes est observée après 24 mois d'administration mensuelle d'ivermectine (Venco et al. 2004). La mort survient chez 40% des vers après 18 mois d'administration de sélamectine (Bowman, Atkins 2009). Une antigénémie nulle est également retrouvée après 9 mois d'administrations mensuelles de moxidectine par voie orale (associée à une antibiothérapie le premier mois) (Ciuca et al. 2023).

Toutefois, ce protocole favorise l'apparition de résistances aux lactones macrocycliques. De plus, la durée nécessaire à l'élimination totale des parasites et des antigènes augmente le risque de progression des lésions cardiopulmonaires. L'AHS recommande ainsi l'utilisation concomitante de lactones macrocycliques et d'une antibiothérapie en cas de contre-indication

à la mélarosimine afin de diminuer la durée de traitement nécessaire à l'élimination de *D. immitis*.

De rares effets secondaires ont pu être observés au cours des études menées tels que des vomissements ou une salivation excessive (Bowman, Mannella 2011). Le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) du Milbemax® (milbémycine oxime, praziquantel) fait ainsi état de réactions d'hypersensibilité. Elles sont liées à la libération massive de protéines issues de la mort des microfilaires et conduisent parfois à l'observation de muqueuses pâles, vomissements, hypersalivation, tremblements ou essoufflement chez les individus traités. Il est donc recommandé de tester l'ensemble des chiens à risque avant d'initier le traitement et que ceux-ci soient administrés sous la supervision d'un vétérinaire.

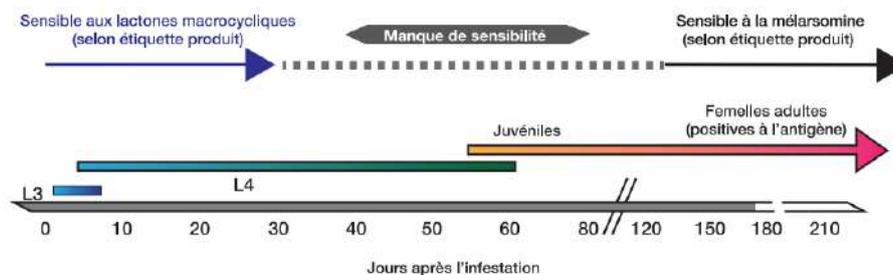


Figure 23 : Périodes de sensibilité aux lactones macrocycliques et à la mélarosimine au cours du développement de *Dirofilaria immitis* (Merial Limited, Duluth 2008)

iii. Traitements adjuvants

- *Anti-inflammatoires stéroïdiens*

L'utilisation de corticostéroïdes permet de limiter l'apparition de signes cliniques liés au phénomène de thromboembolie ou à la mort massive des parasites (réaction d'hypersensibilité). Comme précédemment évoqué (dans la partie 1.VI.2.a.i), lors de charge parasitaire importante, une corticothérapie à base de prednisolone peut être prescrite au cours du mois suivant la première injection de mélarosimine. Il est ainsi recommandé d'administrer la prednisolone par voie orale à 0,5 mg/kg deux fois par jour durant la première semaine, puis une fois par jour la deuxième semaine et un jour sur deux durant 1 à 2 semaines (American Heartworm Society 2014).

En 2017, Yoon et al. ont cependant démontré chez des chiens malades recevant une corticothérapie, l'augmentation d'un des marqueurs de thromboembolie, les D-dimères. Ainsi, l'ajout de corticoïdes participerait à l'exacerbation du risque de thromboembolie parasitaire. La corticothérapie ne doit donc en aucun cas être mise en place chez les animaux asymptomatiques. Cet article montre ainsi la nécessité d'une étude à grande échelle afin d'évaluer les effets réels d'une corticothérapie chez les animaux souffrant de dirofilariose cardiopulmonaire.

- *Doxycycline*

La bactérie endosymbiotique *W. pipientis* est sensible à l'administration de doxycycline. Le traitement induit une diminution du nombre de bactéries et limite ainsi à la fois la libération massive de protéines de surface (WSP) et la réaction inflammatoire rénale et pulmonaire associée (Bandi, Trees, Brattig 2001). L'administration de doxycycline permet une réduction significative des marqueurs de l'inflammation : la CRP (Protéine C-Réactive) et l'interleukine 6 (IL-6) chez les individus malades (Yoon et al. 2017). L'antibiothérapie en éliminant les bactéries endosymbiotiques cause une inhibition du développement larvaire et l'infertilité des femelles adultes menant à une diminution, sans élimination complète, des microfilaires circulantes.

Toutefois, des études récentes rapportent l'utilisation conjointe de doxycycline et de la moxidectine (seule molécule recommandée par la FDA), dans le traitement de la maladie. Une élimination totale des microfilaires est notée après 120 jours de traitement (Ciuca et al. 2023). Une amélioration des lésions observables à la radiographie a également pu être notée.

De plus, l'usage de la doxycycline prive les microfilaires de *W. pipientis*. Ainsi, lors de leur transmission à un hôte vecteur au cours d'un repas de sang, les microfilaires évolueront en L3 non infestantes. L'antibiothérapie semble donc jouer un rôle dans la prévention de la transmission de la dirofilariose (McCall et al. 2008).

La posologie recommandée par l'AHS est actuellement de 10 mg/kg deux fois par jour pendant quatre semaines. Cependant, des rapports d'intolérance de certains chiens (diarrhée, vomissement) aux doses recommandées de doxycycline ont motivé la réalisation d'études dans le but d'évaluer la dose minimale de doxycycline à administrer afin de limiter ces effets

indésirables tout en éliminant les bactéries. Ainsi, aucun effet indésirable n'est observé lors d'administration de doxycycline à 5 mg/kg BID chez des chiens parasités comparativement à une posologie de 10 mg/kg (Savadelis et al. 2018). Cependant, chez les chiens traités à 5 mg/kg BID, la concentration en doxycycline ne permet pas une élimination complète de *W. pipientis*. Plus récemment, en 2020, Carretón et al., ont quant à eux démontré qu'aux deux posologies différentes, une diminution significative et suffisante de la population de *Wolbachia* pouvait être observée. Il est également admis que l'usage de doxycycline à la posologie recommandée par l'AHS favorise l'émergence de résistances auprès d'autres bactéries telles que *Staphylococcus* ou *Enterococcus* (Tejedor-Junco et al. 2018).

Les traitements alternatifs, n'utilisant pas le traitement de consensus recommandé par l'AHS, sont utilisés dans différents pays endémiques pour la dirofilariose. Ainsi, en Italie, 30% des structures vétérinaires utilisent les traitements de "mort lente" par association d'une lactone macrocyclique et de doxycycline (Ciuca et al. 2023).

- *Synthèse des traitements à administrer en cas de complications*

L'ensemble des traitements à mettre en place lors de complications liées à la dirofilariose cardiopulmonaire ou bien à son traitement est résumé dans le tableau suivant (Ames, Atkins 2020).

Tableau 8 : Principaux traitements mis en place lors de complications liées à la dirofilariose cardiopulmonaire chez le chien ou bien à son traitement (Ames, Atkins 2020)

Processus	Traitement
Réaction d'hypersensibilité en réponse à la mort des microfilaires	Diphenhydramine (anti-histaminique) 2 mg/kg BID IM Dexaméthasone 0,2 mg/kg SID IV Fluidothérapie adaptée aux besoins
Réaction d'hypersensibilité en réponse à l'administration de mélarsomine	Cf. Ci-dessus En cas de détresse respiratoire, d'hypotension, de défaillance organique : épinéphrine 0,01 mg/kg IM, pouvant être répété toutes les 5 à 15 min au besoin ou en perfusion continue à 0,05 µg/kg/min
Inflammation des muscles épaxiaux	AINS à 0,2 mg/kg SID IV puis 0,1 mg/kg SID PO Tramadol 3-5 mg/kg TID PO Gabapentine 10-20 mg/kg TID PO

Pneumonie	Oxygénothérapie Dexaméthasone 0,2 mg/kg SID IV
Thrombo-embolie pulmonaire	Oxygénothérapie Sildénafil 1-2 mg/kg TID PO Corticothérapie dont la posologie et la voie d'administration doivent être adaptées selon la sévérité de la pneumonie Clopidogrel 1-2 mg/kg SID PO
Insuffisance cardiaque congestive	Furosémide 2–6 mg/kg/day, PO Pimobendane 0.25 mg/kg BID PO Sildénafil 1–2 mg/kg TID PO Spironolactone 2 mg/kg SID PO Ponction/drainage thoracique

b. Traitement chirurgical

La prise en charge chirurgicale est le traitement associé au risque minimal de thromboembolie. Elle consiste en une extraction des vers adultes des artères pulmonaires, de la veine cave et du cœur. Il s'agit du traitement d'urgence lors de syndrome de la veine cave chez le chien.

L'intervention, majoritairement pratiquée au Japon, peut être réalisée sous anesthésie locale ; l'état de l'animal à l'admission contre-indiquant souvent l'anesthésie générale. De nombreuses publications soulignent néanmoins l'intérêt de mettre en place des mesures médicamenteuses avant l'intervention dans le but de stabiliser l'animal et de minimiser les effets indésirables secondaires à la chirurgie (prednisolone à 0,5 mg/kg BID PO, doxycycline 5 mg/kg BID PO, clopidogrel 2 à 4 mg/kg SID PO durant une semaine en amont de la chirurgie). L'extraction débute par une veinotomie par abord latéral gauche au niveau de la veine jugulaire. Un guide fil est alors introduit jusqu'au cœur droit et aux artères pulmonaires, puis remplacée par une gaine d'introduction dans laquelle vont venir se glisser : une pince "alligator", une pince "forceps tripode" ou une pince "basket" selon l'outil utilisé (**Figure 24**). L'extraction de la totalité des individus nécessite bien souvent de nombreux allers-retours à l'aveugle ou sous contrôle échographique ou fluoroscopique. La procédure prend fin dès l'absence de filaires adultes observées à l'échocardiographie.

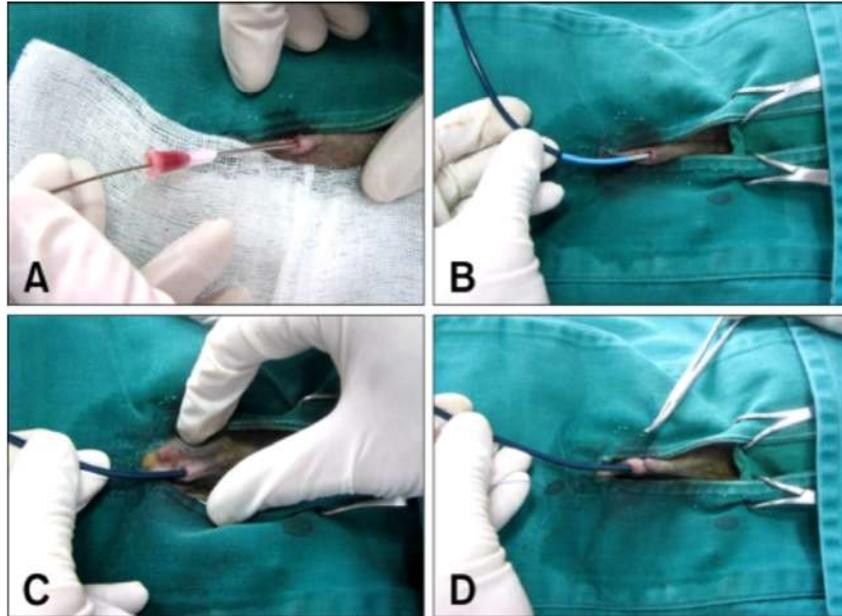


Figure 24 : Photographies des différentes étapes du traitement chirurgical de la dirofilariose cardiopulmonaire.

A- Veinotomie de la veine jugulaire gauche à l'aide d'une aiguille 18G et insertion du guide fil jusqu'à l'artère pulmonaire. B- Remplacement du guide fil par une gaine d'introduction. C- Retrait du guide fil et maintien de la gaine. D- Fixation de la gaine à l'aide d'une suture (Lee, Moon, Hyun 2008)

Les principaux risques de cette procédure sont cardiaques : troubles du rythme, tachycardie, arrêt cardiaque ... et sont majorés chez les chiens de petit format compte tenu du rapport entre le diamètre des vaisseaux et le diamètre des instruments chirurgicaux utilisés (Yoon, Han, Hyun 2011).

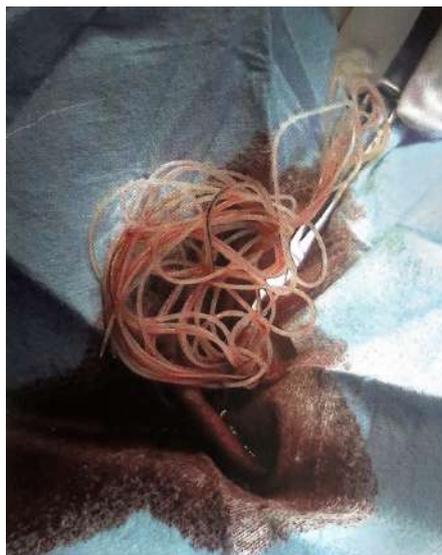


Figure 25 : Adultes de *Dirofilaria immitis* retirés chirurgicalement du ventricule droit du cœur d'un chien parasité (Beugnet, Halos, Guillot 2018)

Un traitement médical reste indispensable même après l'extraction chirurgicale des parasites adultes. Ainsi, il est recommandé d'administrer de la mélarsomine dans les semaines suivant la procédure et de mettre en place des mesures d'élimination des stades larvaires. Selon les lésions associées à la pathologie, la mise en place d'un traitement de support de la fonction cardiaque est parfois nécessaire (Beugnet, Halos, Guillot 2018).

c. Spécificités du traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire en Nouvelle-Calédonie

Selon le questionnaire soumis aux praticiens, 100% d'entre eux disposent de spécialité à base de mélarsomine pour le traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire. Parmi les structures interrogées, 62,5% préconisent systématiquement la thérapie adulticide en première intention. Environ 12% ne prescrivent jamais de traitement adulticide. Le quart restant adapte le protocole à l'état clinique de l'animal traité. Les spécialités adulticides sont coûteuses. La réalisation du traitement peut être freinée par son prix et le labeur de sa mise en place. En effet, le chien doit être mis au repos durant plusieurs semaines car les risques de thrombo-embolie sont élevés. En Nouvelle-Calédonie, les chiens vivent majoritairement en extérieur, ainsi il est nécessaire que l'animal soit mis à l'attache.

Lorsque la mélarsomine est préférée, les vétérinaires calédoniens s'accordent sur deux protocoles :

- Le protocole à deux injections à 24h d'intervalle chez les animaux asymptomatiques ;
- Le protocole en 3 injections (une injection puis un mois plus tard, deux injections à 24h d'intervalle) chez les individus symptomatiques.

Environ 25% des structures interrogées utilisent le protocole en 3 injections quel que soit l'état clinique de l'animal.

Les traitements de « mort lente » sont privilégiés dans le cas où l'état de l'animal ou les moyens des propriétaires ne permettent pas la thérapie adulticide. Les chiens traités suivent alors un protocole par administration mensuelle de lactones macrocycliques. Environ 2/3 des praticiens choisissent l'ivermectine par voie injectable hors AMM (Ivomec® et Cevamec®). Les vétérinaires restants prescrivent des lactones macrocycliques par voie orale.

Le statut de l'animal vis-à-vis de la dirofilariose est de nouveau testé à l'issue du traitement. Ainsi, plus d'un tiers des structures interrogées réitèrent le test dans un intervalle de 8 mois à 1 an si les propriétaires le souhaitent. Moins d'un tiers le réitèrent 2 ans après le traitement. Ce

test vise à s'assurer du retour à un statut antigénémique négatif à la dirofilariose cardiopulmonaire.

Concernant les traitements adjuvants, une corticothérapie est quasi-systématiquement prescrite par les vétérinaires. L'antibiothérapie (doxycycline) est systématisée chez la moitié des praticiens interrogés. En ce qui concerne les vétérinaires restants, ils y ont quelques fois recours, selon le cas.

En Nouvelle-Calédonie, l'aspirine rentre également dans l'arsenal thérapeutique du vétérinaire pour le traitement de la dirofilariose. Ainsi, environ 25% des structures vétérinaires interrogées en prescrivent de façon systématique (**Annexe 7**). La majorité des vétérinaires restants n'en utilise jamais dans ce contexte. Par ailleurs, l'aspirine est actuellement contre-indiquée dans le traitement de la dirofilariose à *D. immitis* (American Heartworm Society 2014).

Dans les encadrés ci-dessous, nous présentons un résumé des informations obtenues via le questionnaire réalisé et diffusé aux praticiens de Nouvelle-Calédonie, sur le diagnostic, le traitement et la prévention de la dirofilariose cardiopulmonaire. Nous rappelons que 8 structures vétérinaires (cliniques et cabinets médico-chirurgicaux) ont participé à ce questionnaire.

Diagnostic

- **37,5% des structures** réalisent systématiquement un test rapide et un test d'observation directe
- **37,5% des structures** réalisent uniquement un test rapide
- **25% des structures** adaptent les tests utilisés à la clientèle dans un souci d'économie

Prévention

En 1^{ère} intention :

- **12,5% des structures** préconisent l'administration mensuelle de lactones macrocycliques
- **12,5% des structures** préconisent l'administration annuelle hors AMM de spécialités longue action (6 mois)
- Les praticiens restants (**75%**) préconisent l'administration annuelle ou bi-annuelle (selon l'AMM) de spécialités longue action

Les vétérinaires interrogés disposent des spécialités suivantes :

- Par voie orale ou topique : HeartGard[®], Milpro[®], Nexgard Spectra[®], Stronghold[®], Selames[®], Evicto[®], Advocate[®], NuHeart[®], ... dont hors AMM (Oramec[®])
- Par voie parentérale : Guardian[®], Proheart 6[®], Proheart 12[®], Afilaria SR6[®] dont hors AMM (Cevamec[®], Ivomec[®])

Traitements

→ **100%** des vétérinaires disposent d'une **spécialité adulticide à base de mélarsomine** (Immiticide®)

- **62,5% des structures** l'utilisent **systematiquement** pour le traitement de la dirofilariose
- **25% des structures** en utilisent régulièrement **selon le cas** (état clinique de l'animal, âge, raisons économiques)
- **12,5% des structures** n'en utilisent **jamais**

Concernant le protocole :

→ **25% des structures** réalisent **systematiquement** le protocole en **3 injections** (J1-J30-J31)

→ **75% des structures** **adaptent le protocole utilisé** à l'état clinique et à l'âge de l'animal (2 injections sur animal asymptomatique ou en bon état général, 3 injections sinon)

Concernant les traitements dits « slow kill » :

→ **67% des structures** utilisent de l'ivermectine par voie injectable (Ivomec®, Cevamec®)

→ **50% des structures** ajoutent **systematiquement** de la doxycycline (concernant les autres ils en ajoutent parfois ou souvent)

→ **87,5% des structures** ajoutent **systematiquement** une corticothérapie

→ **50% des structures** ajoutent systematiquement de l'aspirine, alors que **62,5% des structures** n'en ajoutent **jamais**

La totalité des vétérinaires interrogés propose de renouveler le test antigénique dans les mois qui suivent le traitement pour s'assurer d'un retour à l'absence d'antigènes.

Figure 26 : Résumé des résultats obtenus à l'issue du questionnaire à l'attention des vétérinaires calédoniens concernant leurs habitudes en termes de diagnostic, de prévention et de traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire

Partie 2 : Estimation de la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire chez la population canine néo-calédonienne

I. Objectifs de l'étude expérimentale

Malgré l'importance de la dirofilariose cardiopulmonaire au sein des cliniques vétérinaires de Nouvelle-Calédonie, il n'existe aucune étude récente s'intéressant à sa prévalence au sein des populations canines du territoire. Cette étude a donc pour objectif de contribuer à son évaluation. L'objectif sous-jacent est d'en informer les collectivités et organismes territoriaux mais aussi les vétérinaires, premiers acteurs de la lutte contre *D. immitis*.

Cette étude expérimentale met en œuvre deux méthodes complémentaires, l'une détectant les antigènes parasitaires et l'autre l'ADN des microfilaires et des filaires adultes.

Dans un premier temps, des échantillons sanguins ont été récoltés en Nouvelle-Calédonie sur des chiens susceptibles d'être infestés. Secondairement, sur chaque échantillon prélevé, deux tests diagnostiques ont été réalisés :

- Un test rapide sérologique de détection d'antigènes de *D. immitis* avec le Dirofilariose canine[®] de KITVIA, réalisé à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) ;
- Une qPCR duplex permettant la détection et l'identification des microfilaires et des adultes de *D. immitis*, après extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin[®] Tissue du laboratoire MACHEREY-NAGEL.

II. Matériels et méthodes

1. Recrutement des chiens et modalités de prélèvement

Les prélèvements sanguins analysés proviennent de chiens présentés en consultation dans les structures vétérinaires de Nouvelle-Calédonie. Au total, 79 prélèvements ont pu être récoltés et transportés jusqu'au laboratoire de l'ENVT. Pour chaque animal inclus dans l'étude, un consentement éclairé signé par les propriétaires du chien et une fiche d'informations (indiquant le signalement de l'animal, son lieu de vie, ses traitements antiparasitaires internes et externes et la présence de signes cliniques) sont joints aux tubes de sang (**Annexe 1, Annexe 2**).

a. Recrutement des chiens

L'objectif de notre étude était de recruter un maximum de chiens, de provenances géographiques les plus variées possible, afin de couvrir, idéalement, l'ensemble du territoire. Les critères de sélection ont permis d'exclure les individus dont la probabilité d'être infestés par *D. immitis* était proche de zéro (jeune âge, chien recevant un traitement prophylactique contre la dirofilariose respectant les recommandations).

Les chiens inclus dans l'étude ont donc été ceux remplissant les critères suivants :

- Âgés d'au moins 1 an au moment du prélèvement ;
- Aucun traitement antiparasitaire externe ou répulsif actif contre les moustiques au cours du mois précédent, ou en cours ;
- N'ayant pas reçu de traitement prophylactique avec de la moxidectine longue action au cours des 6 derniers mois (Guardian[®], ProHeart[®] 6) ou au cours des 12 derniers mois (ProHeart[®] 12) ;
- Ne recevant pas de traitement mensuel à base de lactones macrocycliques.

Aucun critère d'inclusion ou d'exclusion n'a été retenu concernant la race, le sexe, le milieu de vie ou la présence de signes cliniques. Ces critères seront par la suite utilisés pour l'exploitation des données. Les animaux prélevés sont en grande majorité des chiens non médicalisés ou présentant une mauvaise observance de l'administration de leur chimioprophylaxie contre la dirofilariose.

b. Modalités de recrutement des chiens

Pour recruter les individus de notre étude, différents moyens de prise de contact ont été mis en œuvre. Les structures vétérinaires contactées correspondent à celles pour lesquelles un moyen de contact a pu être trouvé sur internet. Le cas échéant, le moyen de contact utilisé a été choisi en fonction des informations dont nous disposions.

- Prise de contact par mail auprès de 18 structures vétérinaires en Nouvelle-Calédonie. Les taux de réponse aux emails et de participation sont reportés ci-dessous (**Tableau 9**) ;
- Prise de contact par réseaux sociaux auprès de 2 structures vétérinaires en Nouvelle-Calédonie ;
- Prise de contact par mail auprès de 3 associations de protection animale.

c. Modalités de prélèvement

Une prise de sang a été réalisée sur chaque chien permettant l'obtention :

- De sang total sur tube EDTA de minimum 1 mL,
- D'un tube sec, centrifugé ou décanté sur place afin d'en extraire le sérum. Ce sérum a par la suite été conservé dans un tube Eppendorf.

Dans certains cas, la nécessité de diagnostiquer la dirofilariose cardiopulmonaire, en l'absence ou en présence de signes cliniques évocateurs, a justifié la réalisation d'un test rapide durant la consultation vétérinaire. Concernant ces individus, la collecte du prélèvement sanguin sur tube sec n'a pas été réalisée puisque le test sérologique a été effectué sur place.

Le site de prélèvement (veine jugulaire, veine saphène externe, veine céphalique) et le matériel utilisé ont été laissés au choix du praticien.

d. Conservation et envoi des échantillons

Après prélèvement et extraction du sérum, les prélèvements ont été conservés à -20°C. Par la suite, les prélèvements ont été centralisés et envoyés tous ensemble par voie aérienne. Avant transport, les échantillons ont été soigneusement emballés dans des pains de glace afin d'optimiser leur conservation.

À leur arrivée en Métropole, les prélèvements de sang total sur anticoagulant et de sérum ont été conservés à -80°C en attendant leur analyse.

2. Méthodes diagnostiques

a. Test rapide de détection des antigènes parasitaires solubles de *D. immitis*

Plusieurs tests rapides de détection de *D. immitis* sont disponibles sur le marché français. Notre choix s'est porté sur le snap-test Dirofilariose canine® du laboratoire KITVIA. C'est un test qualitatif de détection de l'antigène de *D. immitis* utilisant la technique de l'immunochromatographie en phase solide. Il est exécutable sur sang total sur anticoagulant, plasma ou sérum. Le snap-test Dirofilariose canine® présente une spécificité de 100% pour une

sensibilité de 94,4% (en comparaison avec la méthode de diagnostic par examen *post-mortem*) (Annexe 4).

Pour quelques individus dont le prélèvement de sang total sur tube sec n'a pu être réalisé, le test rapide a été effectué à partir de sang total prélevé sur tube EDTA.

Avant chaque test, chaque échantillon de sérum est décongelé puis centrifugé afin d'éliminer les précipités éventuels. Les tests rapides sont ouverts et déposés à plat sur un plan de travail propre. Le surnageant de chaque échantillon est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur à usage unique. Deux à trois gouttes de sérum (ou de sang total) sont déposées dans le puit du snap-test correspondant. Les tests rapides sont identifiés avec la date de réalisation du test, le numéro de l'échantillon déposé et l'heure de début de migration. Les résultats sont lus une fois celle-ci complétée et avant le délai de 10 minutes maximal, selon les recommandations du fabricant.



Figure 27 : Photographie de la lecture de résultats de trois tests rapides de diagnostic sérologique

Pour trois chiens, le test rapide a été réalisé à partir du prélèvement sanguin sur tube EDTA, le prélèvement sur tube sec n'ayant pas été possible. Deux des tests rapides réalisés à partir de ces prélèvements se sont révélés non interprétables du fait de l'absence de migration du sang au sein du dispositif. L'usage d'un échantillon de sang total sur anticoagulant congelé n'est généralement pas recommandé par le fabricant. Cependant, l'efficacité de la méthode avec ce type de prélèvement a été démontré par comparaison avec une méthode de diagnostic moléculaire (Semat 2016).

b. PCR Duplex quantitative

La technique de qPCR décrite ci-dessous a été réalisée par le département de médecine vétérinaire de l'Université de Bari en Italie, après extraction d'ADN réalisée à l'ENVT. La méthode moléculaire permet la détection de l'ADN de *D. immitis* et de *D. repens* (non développé ici), quel que soit le stade évolutif (stades immatures et adultes).

La méthode PCR suivie est celle présentée dans l'article de Latrofa et al. (2012).

i. Extraction de l'ADN

Le kit d'extraction utilisé est le NucleoSpin® Tissue du laboratoire MACHEREY-NAGEL. Cette technologie permet une purification des acides nucléiques par liaison à des membranes de silice. Ces kits peuvent être utilisés sur tissus, écouvillons, liquides organiques, sang ou cellules (bactéries par exemple). Les cellules, membranes et autres protéines sont lysées par voie enzymatique tandis que l'ADN reste empaqueté au sein de colonnes de rotation.

L'ADN génomique est extrait à partir de 200 µL de sang total prélevé sur EDTA pour chaque échantillon. Les prélèvements ayant été congelés, il est nécessaire de procéder à une décongélation avant extraction.

Le protocole débute par la mise en contact de l'échantillon avec un mélange de protéinase K (enzyme protéolytique) et de chlorure de guanidinium (agent chaotropique dénaturant des protéines). L'agitation de la solution ainsi créée provoque une lyse enzymatique des cellules, des membranes lipidiques et une dénaturation des composés protéiques. Puis, de l'éthanol à 96-100% est ajouté au mélange afin de favoriser la fixation de l'ADN. Par la suite, le mélange est soumis à une étape de centrifugation rapide. L'ADN libre se fixe alors sur les membranes de silice. Deux lavages successifs permettent l'élimination des composants cellulaires non fixés. La membrane de silice est ensuite séchée et l'ADN est extrait dans un tampon d'élution (**Annexe 5**). L'échantillon d'ADN purifié est conservé sous couvert de froid à -20°C jusqu'à envoi pour réalisation de la PCR.

ii. Détermination de l'ADN Matrice et des amorces

La PCR quantitative utilise un fragment d'ADN de longueur définie, spécifique de l'espèce à mettre en évidence. Ce fragment, appelé ADN matrice, correspond à la portion du matériel génétique qui sera amplifié au cours des cycles de réplication. Dans notre étude, la qPCR est dite "duplex", c'est-à-dire qu'elle permet la mise en évidence et la différenciation de deux espèces de filaires : *D. immitis* et *D. repens*. Pour *D. immitis*, l'ADN matrice correspond à une région de la sous unité 1 du gène du cytochrome C oxidase mitochondrial (cox1) de 170 paires de bases (bp). Chaque réaction met également en œuvre deux amorces oligonucléotidiques "sens et "anti-sens". Les amorces utilisées pour la réplication de l'ADN matrice de *D. immitis* ont été décrites par Latrofa et al. (2012) : DI COI-F1 et DI COI-R1.

iii. Principe de la PCR en temps réel avec la méthode EvaGreen®

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique de réplication de l'ADN *in-vitro*. La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) permet de mesurer la quantité initiale d'ADN par mesure du nombre d'amplicons (fragments d'ADN amplifiés). Elle permet de suivre en "temps réel" le processus d'amplification par détection et quantification d'un composé fluorescent. En effet, l'émission de ce composé est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction. Il existe deux méthodes de détection quantitative des amplicons : les sondes fluorescentes et les agents intercalant se liant à l'ADN double brin (SYBR Green® et EvaGreen®). Lors de la mise en œuvre de la PCR, les équipes de l'Université de Bari ont utilisé un agent intercalant : l'EvaGreen®. Cette molécule émet une fluorescence intense lorsqu'elle est liée à l'ADN double brin et aucune fluorescence sous sa forme libre en solution. Ainsi, lorsque la quantité d'ADN amplifié augmente, le nombre de molécules fluorescentes fixées augmentent. La fluorescence de la solution augmente également.

Le mélange réactionnel de la qPCR se compose de l'extrait d'ADN à amplifier (ou ADN matrice), de l'ADN polymérase, des amorces, des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) en excès et l'EvaGreen®. Ce mélange est soumis à des cycles de variations de température réitérés de nombreuses fois dans un thermocycleur. Dès la fin de chaque cycle, les valeurs de fluorescence émise sont enregistrées. La quantité d'amplicons peut donc être suivie tout au long de la procédure. Le profil d'une réaction de PCR quantitative peut se décomposer en trois étapes :

- L'étape de "bruit de fond" : la quantité d'amplicons est trop faible pour générer une fluorescence suffisante (par rapport au bruit de fond)
- La phase exponentielle de croissance : la quantité de fragments d'ADN répliqués génère une fluorescence supérieure à la limite de détection de l'appareil. Le nombre d'amplicons double à chaque cycle
- La phase de plateau : certains éléments (notamment l'ADN Polymérase) du mélange réactionnel deviennent limitants.

On définit également le "cycle seuil" (Ct ou *cycle threshold*) qui correspond au nombre de cycles nécessaire pour que la fluorescence devienne supérieure au bruit de fond. Il apparaît systématiquement au cours de la phase exponentielle. Ainsi, plus le Ct est faible, plus la quantité d'ADN matrice dans l'échantillon initial est importante.

iv. Validation des résultats par la présence de témoins positif et négatif

Des échantillons d'ADN de *D. immitis* et de *D. repens* constituent les témoins positifs. Ces échantillons ont été obtenus à partir, respectivement, de sang prélevé chez un chien naturellement infesté par *D. immitis* et d'adultes de *D. repens* collectés sur un chien. Tous sont originaires d'Italie. Ils permettent la validation des résultats de la PCR. Les températures de fusion (T_m) et les cycles seuil (Ct) spécifiques de chaque espèce sont obtenus à partir de ces extraits. La température de fusion ou T_m correspond à la température pour laquelle 50% de l'ADN double brin d'un amplicon est dissocié. Elle est spécifique de l'amplicon donné. Elle s'évalue sur la courbe de dissociation (ou courbe de fusion) obtenue à partir de la fluorescence en fonction de la température.

Le témoin négatif de la qPCR est un mélange réactionnel sans ADN. Aucun signal fluorescent n'est obtenu au niveau du puit correspondant à ce témoin.

v. Protocole de la PCR quantitative ou PCR en temps réel

- *Préparation des puits*

Chaque puit contient une solution d'un volume de 20 µL constitué de 16 µL de mélange réactionnel "Mix" et de 4 µL de solution contenant les extraits d'ADN.

L'ensemble des composants doit être décongelés avant utilisation.

Le "Mix" ou mélange réactionnel utilisé pour la PCR en temps réel contient :

- 5 µL de Diéthyl Pyrocarbonate (DEPC), RNases et DNases free, protéases free ;
- 7 µL de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA).
Ce mélange contient les molécules fluorescentes EvaGreen®, l'ADN Polymérase et les dNTPs. Ce mélange contient tous les composés nécessaires à la qPCR à l'exception des amorces spécifiques de l'ADN matrice ;
- 5 pmol d'amorce DI COI-F1 par puit ;
- 5 pmol d'amorce DI COI-R1 par puit ;
- 100 pmol d'amorce Dr ITS2-F par puit ;
- 100 pmol d'amorce Dr ITS2-R par puit.

Chaque plaque subissant un run de PCR quantitative se compose de puits contenant :

- Les extraits d'ADN de chacun des chiens à tester,
- Les extraits d'ADN de filaires de *D. immitis* (témoin positif),
- Les extraits d'ADN de filaires de *D. repens* (témoin positif),
- Le mélange réactionnel absent d'ADN (témoin négatif),

La présence de témoins positifs et négatifs permet de s'assurer du bon déroulement des manipulations et du procédé. En effet, un signal fluorescent doit être obtenu pour les deux témoins positifs, associés à des Tm correspondant aux données bibliographiques. De la même façon, aucun signal fluorescent ne doit être obtenu pour le puit contenant le témoin négatif. En cas de non obtention des résultats attendus, une anomalie lors de l'extraction ou des manipulations de la PCR doit être suspectée. La PCR en temps réel est effectuée dans un instrument CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA). Les mesures de fluorescence sont enregistrées et les informations analysées avec le CFX Manager™ Software Version 2.1 (Bio-Rad).

- *Amplification lors de la PCR*

La succession de cycles constitués de phase de dénaturation, d'hybridation et d'élongation est appelée « programme d'amplification ».

Trois étapes permettent la réplification de l'amplicon sélectionné :

1. Dénaturation thermique dite "hot-start" de chauffage à 95°C pendant 10 minutes permettant la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin

2. Succession de 40 cycles de deux étapes :
 - Chauffage à 95°C pendant 15 secondes participant à la dénaturation de l'ADN
 - Phase d'hybridation et élongation à 60°C pendant 1 minute

À la fin des cycles, on procède à la vérification que l'amplicon soit bien celui demandé. Pour cela, la courbe de fusion du produit d'amplification est nécessaire. Le produit de PCR est alors chauffé à 95°C pendant 20 secondes puis refroidi à 55°C pendant 20 secondes et réchauffé lentement à 95°C par palier de 0,5°C. À partir de la courbe de fusion obtenue, on obtient le T_m de l'amplicon.

- *Précautions lors des manipulations*

Les précautions prises lors l'extraction d'ADN ont pour objectif d'éviter la contamination des échantillons par de l'ADN autre que celui de l'échantillon prévu initialement. Le risque est qu'un échantillon, et donc un animal testé, se retrouve faussement positif.

En ce sens, une attention particulière est portée à la manipulation des prélèvements ainsi qu'à la propreté du matériel utilisé :

- Le port d'une blouse et de gants stériles propres est obligatoire lors des manipulations. Le port de gants permet également d'éviter le dépôt de film lipidique sur les plaques de PCR pouvant entraîner des erreurs de lecture lors du scannage optique et erroner les résultats.
- Les paillasses et le petit matériel non à usage unique sont soigneusement nettoyés après chaque utilisation
- Les cônes à filtres permettant le prélèvement de l'ensemble des solutions (extraits d'ADN, mélange réactionnel, eau stérile, ...) sont à usage unique.
- Un poste de travail différent est alloué à chaque étape.

III. Résultats

Pour chaque animal inclus dans l'étude, les résultats des méthodes diagnostiques ainsi que leur anamnèse sont détaillés dans l'annexe correspondante (**Annexe 8**).

1. Origines et nombre de chiens inclus dans l'étude

Deux structures vétérinaires ont répondu à nos sollicitations et ont accepté de participer à la réalisation des prélèvements :

- La clinique vétérinaire de la promenade à Nouméa ;
- Le cabinet vétérinaire Mont-Véto au Mont-Dore pour lequel les prélèvements ont été en partie réalisés par moi-même dans le cadre d'un remplacement effectué en juillet et août 2022.

Aucune association de protection animalière n'a souhaité participer à l'étude. Soixante-dix-neuf prélèvements ont ainsi pu être récoltés et analysés dans l'objectif de contribuer à l'évaluation de la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire sur le territoire.

Tableau 9 : Taux de réponse et participation des structures vétérinaires contactées

Nombre de structures vétérinaires contactées	Nombre de réponses aux emails	Nombre de vétérinaires ayant fait parvenir des prélèvements	Nombre de prélèvements reçus
18	9	2	61

Parmi les prélèvements analysés, quatre proviennent de chiens dont les propriétaires font partie de mon cercle familial (**Figure 28**).

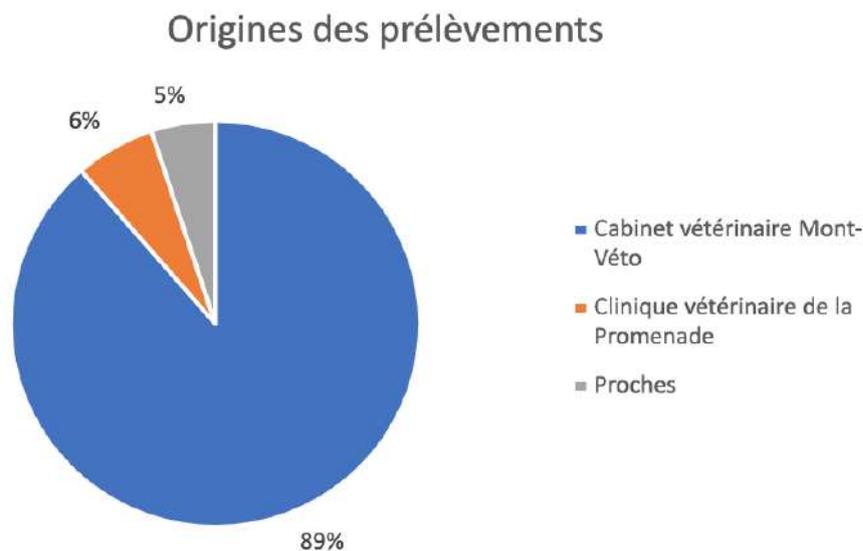


Figure 28 : Diagramme circulaire représentant l'origine des prélèvements sanguins (N = 79)

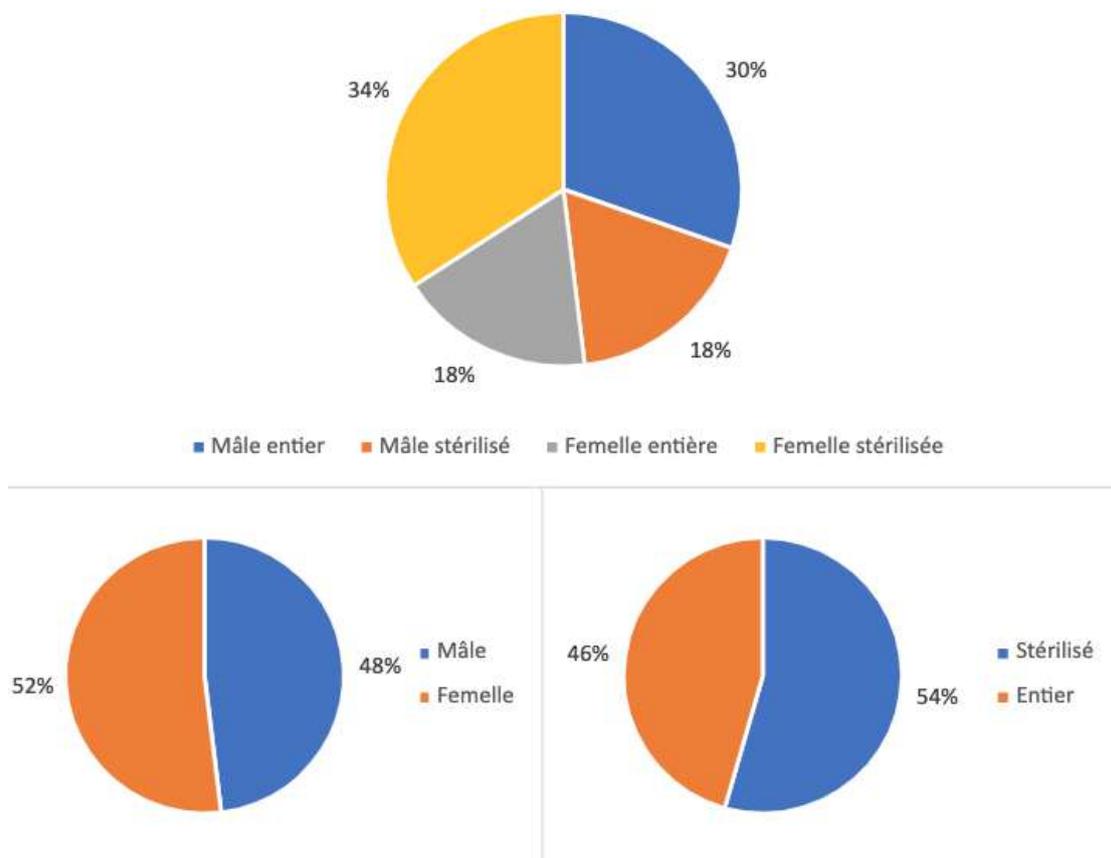
2. Analyse de la population canine étudiée

L'effectif total compte 41 chiens femelles et 38 mâles. Le *sex ratio* mâles/femelles est de 0,92. Plus de la moitié des animaux prélevés sont stérilisés. Cependant, deux tendances se dégagent concernant le statut sexuel :

- Les femelles sont majoritairement stérilisées (65% des individus femelles sont stérilisés) ;
- Les mâles sont principalement des mâles entiers (les individus stérilisés ne représentent que 37,5% des mâles) (**Figure 29**).

L'âge des chiens prélevés a également été répertorié lors du recueil d'informations. Par la suite, les individus ont pu être regroupés par tranche d'âge (**Figure 29**). Trente pourcents des chiens admis dans l'étude sont âgés de plus de 8 ans. Cependant, la répartition des animaux est globalement homogène au sein des autres tranches d'âge, à l'exception des classes de 2 à 4 ans représentant 31% des individus.

Sexe et statut des chiens



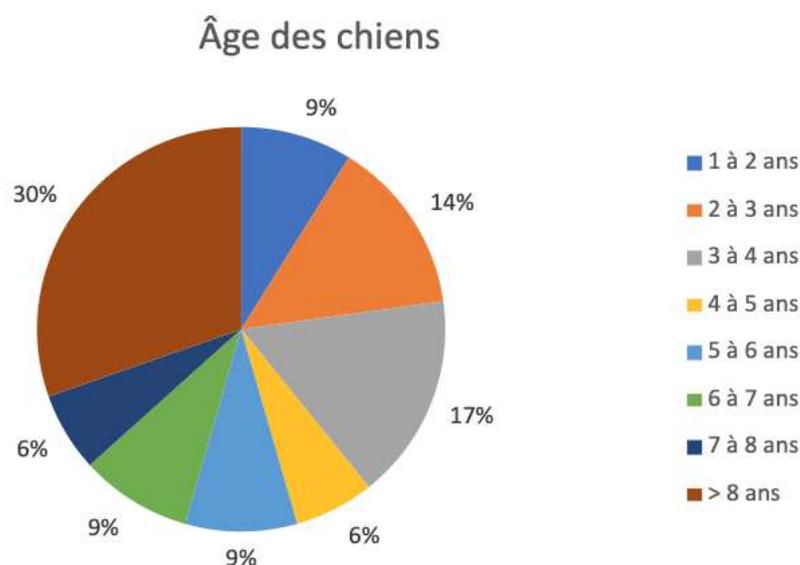


Figure 29 : Diagrammes circulaires représentant les profils épidémiologiques des chiens prélevés au cours de l'étude (N = 79)
Figures A,B et C : Sexe et statut physiologique des individus inclus dans l'étude
Figure D : Âge des individus inclus dans l'étude

La population étudiée comprend autant de chiens dits de "race pure" que de chiens issus d'un croisement. Il est tout de même à noter que la notion de "race pure" reste compliquée à démontrer compte tenu de l'absence de certificat officiel et notamment d'inscription au LOOF. Les propriétaires habitent pour près de 80% d'entre eux à proximité de la côte (moins de 2 km de distance). De plus, 77% des chiens de la population étudiée vivent la majeure partie de leur temps en extérieur. Leur lieu de couchage est extérieur au domicile et ils sont hors du logement notamment pendant les périodes de forte activité des moustiques.

L'historique médical des chiens a permis d'établir une classification selon qu'ils soient médicalisés ou pas. Dans la population, 25% des chiens prélevés sont considérés comme médicalisés. On entend par là des chiens ayant reçu soit :

- une injection vaccinale il y a moins de 18 mois,
- l'administration d'une spécialité longue action de chimioprophylaxie de la dirofilariose à durée d'action égale à 6 mois, il y a plus de 6 mois et moins d'un an,
- l'administration d'une spécialité longue action de chimioprophylaxie de la dirofilariose à durée d'action égale à un an, il y a plus d'un an et moins de 18 mois,
- l'administration régulière de molécules chimioprophylactiques de la dirofilariose de courte durée d'action, mais dont l'administration ne répond pas aux recommandations de l'AHS.

3. Résultats du snap-test Dirofilariose canine® de KITVIA et étude statistique

Sur les 79 chiens de notre étude, 46 ont été testés par diagnostic sérologique au cours d'une consultation chez leur vétérinaire traitant. Ce test s'inscrit généralement dans un contexte de reprise ou d'initiation de protocole de prévention de la dirofilariose cardiopulmonaire, mais aussi parfois suite à l'apparition de signes cliniques évocateurs. Au sein des structures participantes, c'est également le test rapide du laboratoire KITVIA qui a été utilisé. Chez les vétérinaires, les tests ont été effectués à partir de sang total prélevé sur EDTA.

Trente-trois chiens présentés en consultation ne présentant aucun signe clinique ont également été prélevés. Le test sérologique pour ces patients a par la suite été réalisé au laboratoire de Parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Sur les 77 tests rapides interprétables, le snap-test s'est révélé positif à la détection des antigènes de *D. immitis* pour 30 individus. Le test rapide Dirofilariose canine® présentant une spécificité de 100%, ces résultats sont donc en faveur d'une infestation par *D. immitis* chez 39% des animaux étudiés.

La répartition des résultats sur le territoire est représentée ci-dessous (**Figure 30**).



Figure 30 : Carte du territoire néo-calédonien répertoriant l'ensemble des résultats au test sérologique en fonction du lieu de prélèvement

L'étude statistique menée a pour but de mettre en évidence et/ou de confirmer les effets des différents facteurs présentés précédemment sur la positivité du test rapide. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de régression binomiale appelé régression logistique. Elle permet d'infirmier ou de confirmer l'existence d'une relation de dépendance entre une variable à expliquer (ici le résultat au test rapide) et une ou plusieurs séries de variables explicatives (ici ce sont nos facteurs). Pour modéliser cela, nous avons utilisé le logiciel RStudio. Un *odd ratio* et son intervalle de confiance seront associés à chaque facteur étudié.

a. Facteur « sexe »

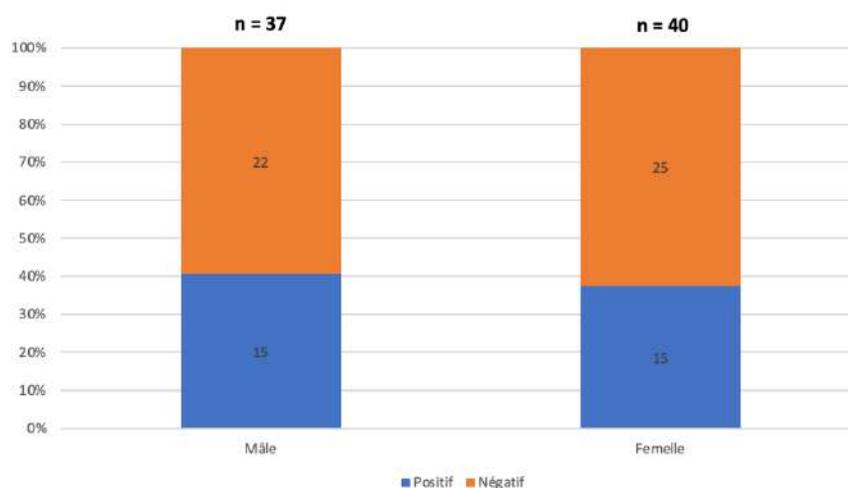


Figure 31 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de D. immitis selon le sexe

Parmi 77 échantillons exploitables, le *sex-ratio* est de 0,925. Les tailles des échantillons d'individus mâles et d'individus femelles sont globalement équivalentes. On remarque un pourcentage de chiens dont le test sérologique est positif à la détection des antigènes de *D. immitis* proche de 40% (respectivement 40,5% pour les mâles et 37,5% pour les femelles) indépendamment du sexe. De prime abord, il semble donc que la prévalence de la maladie ne soit pas influencée par le sexe des individus (**Figure 31**).

Tableau 10 : Résultats obtenus au test rapide *Dirofilariose canine*[®] selon le sexe des individus testés

	Mâle	Femelle
Positif	15	15
Négatif	22	25

Au cours de l'exécution du script sur RStudio, le niveau « Femelle » du facteur « Sexe » est pris comme modalité de référence. L'*odd ratio* calculé est de 0.936. L'intervalle de confiance à 95% est compris entre 0.307 et 2.804. L'intervalle de confiance contenant la valeur 1, il est impossible de conclure car le risque est inconnu.

b. Facteur « statut sexuel »

Le statut sexuel d'un animal correspond à son statut stérilisé ou non (l'animal est alors défini comme « entier »). Comme noté précédemment, dans la population étudiée, 54% des individus sont stérilisés.

La stérilisation est un paramètre intéressant à étudier au cours de notre travail de thèse car elle peut être en lien avec la médicalisation de l'animal. En effet, la consultation de stérilisation est généralement effectuée aux alentours des 6 mois de l'animal, correspondant en moyenne au début de la puberté. Selon les recommandations de l'American Heartworm Society (2014), la chimioprophylaxie doit être initiée dès les 8 semaines de l'animal en zone à risque. En pratique, avant 6 mois, les praticiens ont bien souvent recours aux antiparasitaires à durée d'action courte, leurs permettant une meilleure adaptation des doses face à la courbe de poids de l'animal. Malheureusement, les prises sont bien souvent irrégulières et ne sont pas en accord avec les recommandations. Au moment de la stérilisation, les vétérinaires praticiens choisissent de débiter la prescription de molécule à durée d'action longue. Le recours à ces spécialités permet une fidélisation du client ainsi qu'une meilleure observance.

Nous pouvons cependant supposer la présence d'un biais dans la concordance entre la stérilisation et la médicalisation des animaux. En effet, en Nouvelle-Calédonie, de nombreuses associations proposent des « bons pour stérilisation ». Ces bons sont attribués à des particuliers à faibles revenus dont les animaux, non stérilisés et en divagation, ont pu donner naissance à une ou plusieurs portées laissées en divagation. Ils permettent ainsi à des propriétaires n'ayant pas les moyens de médicaliser leur animal, de bénéficier d'une stérilisation à moindre frais.

Ainsi, les animaux stérilisés à l'issue de l'attribution d'un « bon pour stérilisation » demeurent souvent des animaux non suivis par un vétérinaire praticien en routine.

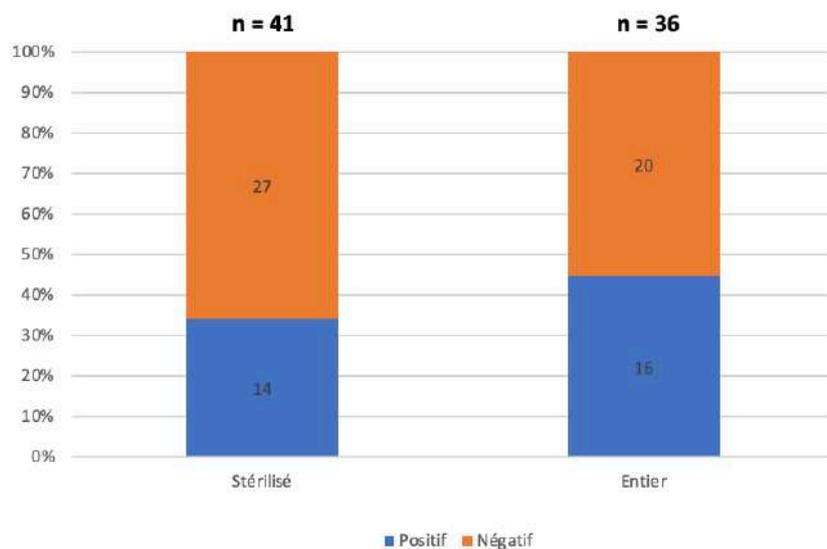


Figure 32 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de *D. immitis* en fonction du statut sexuel

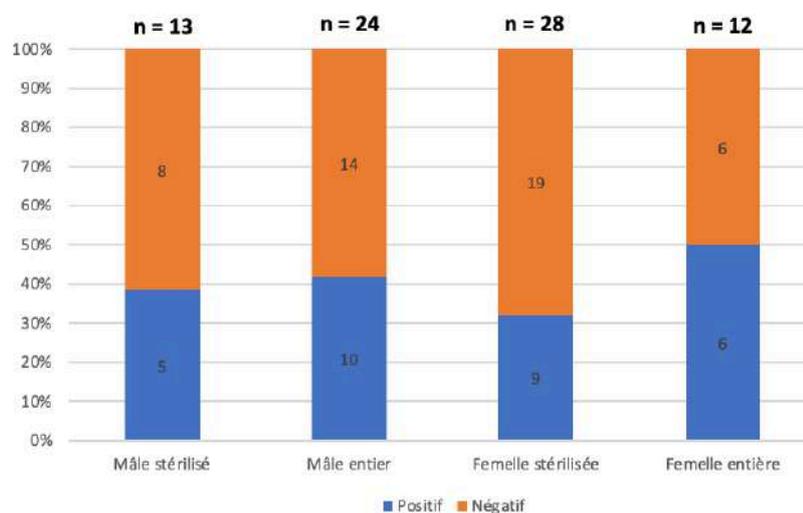


Figure 33 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de *D. immitis* en fonction du sexe et du statut sexuel

Dans notre étude, 34,1% des chiens stérilisés et 44,4% des chiens entiers (tous sexes confondus) sont positifs du test de détection des antigènes de *D. immitis* (Figure 32). Le lien entre le statut sexuel et la positivité au test est nettement plus marqué chez les femelles que chez les mâles.

Cependant, il reste complexe d'affirmer une influence du statut sexuel de l'animal sur son infestation par *D. immitis*.

Tableau 11 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine® selon le statut sexuel des individus testés

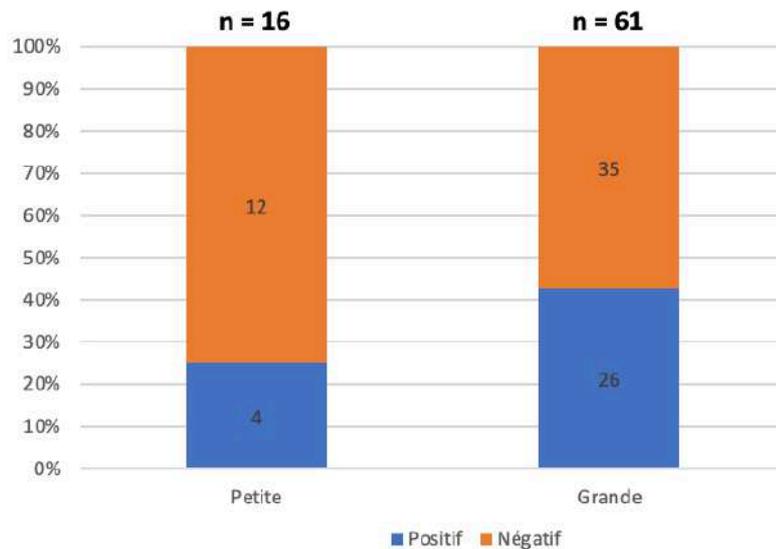
	Stérilisé	Entier
Positif	14	16
Négatif	27	20

Le niveau « Entier » est pris comme modalité de référence lors de l'exécution du script pour le facteur « Statut sexuel ». L'*odd ratio* calculé est de 0.581. L'intervalle de confiance à 95% est compris entre 0.185 et 1.744. Comme précédemment, l'intervalle de confiance contenant la valeur 1, le risque est inconnu et il est impossible de conclure.

c. Facteur « race »

L'information sur la race de chaque individu a été collectée à l'aide du formulaire d'accompagnement du prélèvement. Afin de simplifier l'analyse des résultats, le facteur « race » a été séparé en deux catégories dont la valeur seuil de séparation a été définie d'après une étude de 2007 (Yildirim et al. 2007) à 18 kg. Ainsi, sont différenciées :

- Les chiens de petite race dont le poids est inférieur à 18 kg,
- Les chiens de grande race dont le poids est supérieur à 18 kg.



*Figure 34 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de *D. immitis* selon la race*

La positivité au test de détection des antigènes parasitaires atteint 42,6% chez les chiens de grande race contre 25% chez les petites races (**Figure 34**). Les prévalences supérieures chez les chiens de grande race ont déjà été décrites dans quelques études européennes (Vieira et al. 2014; Yildirim et al. 2007). L'effet race serait relié au fait que les chiens de grande taille sont plus souvent utilisés comme chiens de travail ou de garde. Ils ont donc un lieu de vie plutôt extérieur. Ils sont ainsi plus susceptibles d'être en contact avec les moustiques infestés. Dans notre population, 25% des chiens de petite taille ont un mode de vie extérieur contre 90,2% des grands chiens. Ceci confirme bien que, sur le territoire, les individus de grande race sont plus exposés aux moustiques et donc à la transmission de la maladie.

De plus, les chiens mâles sont davantage utilisés en tant que chiens de travail ou de garde. Cette observation explique les prévalences significativement plus élevées de la dirofilariose chez les mâles, mises en évidence par de nombreuses études (Yildirim et al. 2007).

Tableau 12 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine® selon la race des individus testés

	Petite	Grande
Positif	4	26
Négatif	12	35

Le niveau « Grande » est pris comme modalité de référence lors de l'exécution du script pour le facteur « Race ». L'odds ratio calculé est de 0.243. L'intervalle de confiance à 95% est compris entre 0.023 et 1.736. De la même façon que précédemment, le risque est inconnu. Il est impossible de conclure.

Une tendance claire se dégageait pourtant visuellement entre les résultats au test des individus de petite race et ceux de grande race. Ainsi, l'impossibilité de conclure à l'issue du test diagnostique peut être liée à un nombre insuffisant d'individus au sein des échantillons testés.

d. Facteur « âge »

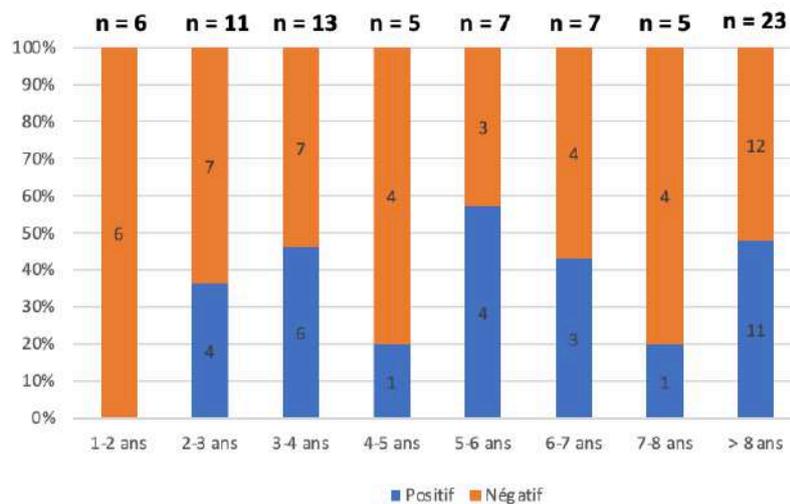
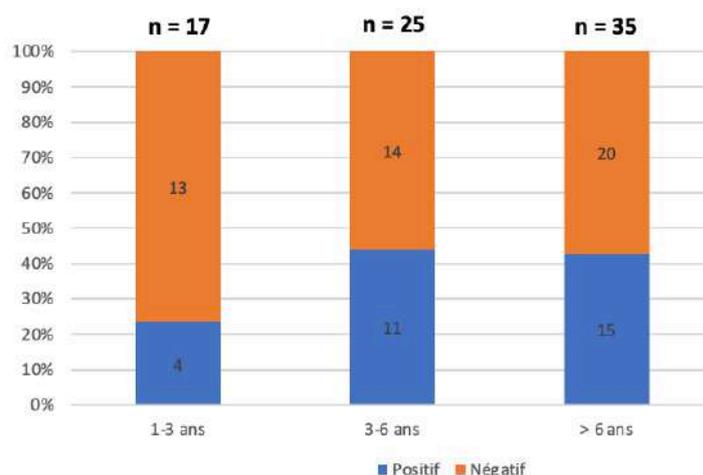


Figure 35 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de *D. immitis* selon l'âge

L'ensemble des classes d'âge sont représentées dans la population canine étudiée. Cependant, le faible nombre d'individus pour chaque tranche rend l'interprétation des résultats difficile. Pour cinq classes sur les huit étudiées, le nombre d'individus total est inférieur ou égal à 7. De grandes disparités dans le pourcentage d'individus positifs au test sont observés selon les classes d'âge considérés (Figure 35).

L'absence d'individu positif chez les chiens âgés de moins de 2 ans doit cependant être soulignée. Plusieurs raisons peuvent être données :

- Un faible nombre d'individus au sein de la classe menant à une mauvaise représentativité de l'échantillon,
- Les chiens de moins de 2 ans ont une probabilité plus faible que les chiens plus âgés d'avoir été un jour en contact avec un moustique porteur de la dirofilariose.



*Figure 36 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de *D. immitis* selon l'âge*

Afin de comparer les résultats obtenus avec la littérature, les différentes classes ont été regroupées. La prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire semble ainsi nettement supérieure chez les individus âgés de 3 à 6 ans et de plus de 6 ans (respectivement 44% et 42,8%) (**Figure 36**). Des études menées en Europe montrent également que les chiens adultes d'âge moyen et vieillissant sont les plus touchés par la pathologie. Ainsi, ils définissent respectivement les classes d'âge les plus atteintes comme étant : les chiens de 4 à 9 ans au Portugal, de 3 à 9 ans en Espagne et de 4 à 10 ans en Turquie (Vieira et al. 2014; Montoya-Alonso et al. 2015; Yildirim et al. 2007).

Tableau 13 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine® selon l'âge des individus testés

	1-3 ans	3-6 ans	> 6 ans
Positif	4	11	15
Négatif	13	14	20

Pour le facteur « Âge », le niveau « 1 à 3 ans » est pris comme référence lors de l'exécution du script. L'*odd ratio* est alors calculé pour chacun des niveaux autre que « 1 à 3 ans » en les comparant au niveau de référence. Nous obtenons ainsi :

- Un *odd ratio* de 1.793 associé à un intervalle de référence à 95% entre 0.376 et 9.325,
- Un *odd ratio* de 1.449 associé à un intervalle de référence à 95% entre 0.324 et 7.001.

Le risque associé au facteur « Âge » est donc inconnu. Nous ne pouvons pas conclure. De la même façon que précédemment, une différence entre les classes d'âge semblait être mise en évidence lorsque la construction des graphiques. L'impossibilité de conclure peut également être liée à un nombre d'individus insuffisant.

e. Facteur « médicalisation »

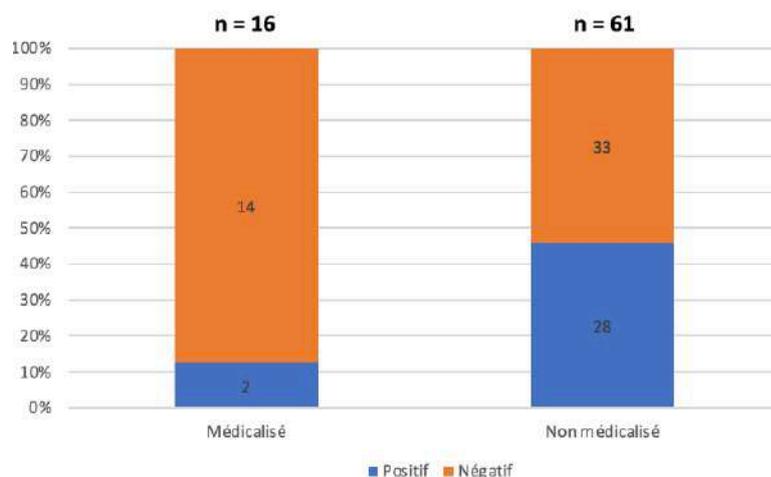


Figure 37 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de D. immitis en fonction du statut vis-à-vis de la médicalisation

Parmi les 30 chiens positifs à la détection d'antigènes, seulement deux sont médicalisés (**Figure 37**). Cette observation sous-tend l'hypothèse de lien étroit entre la positivité aux tests diagnostiques et l'absence de chimioprévention adaptée (APE, API de courte durée ou longue action) qui sera évoquée au cours de l'étude statistique. De plus, lorsque nous nous intéressons aux deux chiens considérés et à leur historique médical, il s'avère que ces deux individus ont été testés positifs à la dirofilariose cardiopulmonaire (test rapide positif) au cours de l'année 2021 et 2022. Ils ont alors été traités selon le protocole utilisé par le cabinet vétérinaire consistant en six injections mensuelles d'ivermectine par voie sous-cutanée. D'après Bowman, Atkins (2009), l'utilisation d'ivermectine permet d'atteindre une élimination d'environ 100% des filaires adultes et des microfilaires après 31 mois de traitement. Ainsi, six mois d'administration ne permettent pas d'éliminer l'ensemble des filaires femelles et de stopper la production d'antigènes. Les individus traités selon ce protocole restent donc positifs au test rapide de diagnostic sérologique.

L'évaluation de ce facteur a été impactée par la difficulté de récolte des informations concernant la prise de traitements chimioprophylactiques par voie orale. En effet, ces spécialités sont pour la plupart également disponibles en pharmacie. Ainsi, leur achat ne

s'effectue pas nécessairement en structure vétérinaire et n'apparaît donc pas dans l'historique médical du patient. Il n'en reste pas moins que, même pour les chiens en recevant régulièrement, les recommandations concernant l'administration de lactones macrocycliques mensuellement pour la prévention de la dirofilariose cardiopulmonaire sont très peu voire jamais respectées.

Tableau 14 : Résultats obtenus au test rapide Dirofilariose canine[®] selon le statut médicalisé ou non des individus testés

	Médicalisé	Non médicalisé
Positif	2	28
Négatif	20	27

Concernant le facteur « Médicalisation », le niveau « Non médicalisé » est pris comme référence lors de l'exécution du script. L'*odd ratio* calculé est de 0.077 avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0.008 et 0.377. Ainsi, l'*odd ratio* est différent de 1 et l'intervalle de confiance ne contient pas la valeur 1. On peut conclure que la non-médicalisation des chiens est un facteur de risque de positivité au test rapide pour la dirofilariose cardiopulmonaire. Cette conclusion est en accord avec les observations graphiques précédemment faites précédemment.

f. Facteur « mode de vie »

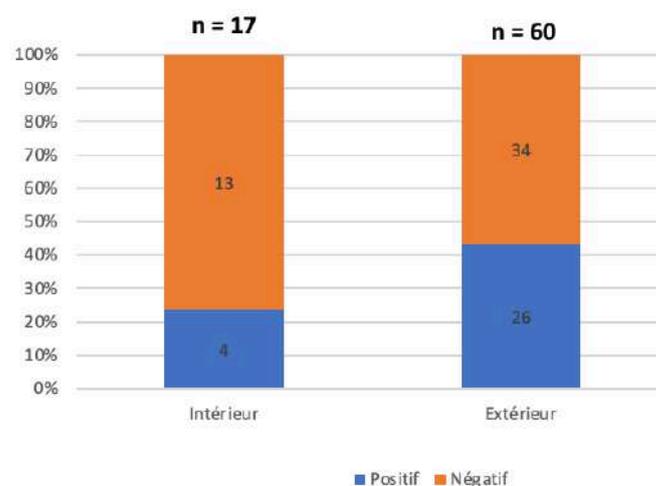


Figure 38 : Répartition des individus positifs et négatifs au test rapide de détection des antigènes parasitaires de D. immitis en fonction du mode de vie

Le facteur « mode de vie » est défini par le lieu de couchage de l'animal. Un animal avec un lieu de couchage intérieur est considéré au sein du domicile la majeure partie du temps, et donc également aux moments de forte activité des vecteurs de la dirofilariose. *A contrario*, les individus au mode de vie « extérieur » sont en grande partie voire en totalité du temps à l'extérieur du domicile et n'ont donc aucune protection spatiale vis-à-vis des moustiques. Cette différence de probabilité de contact entre l'animal et le vecteur de la maladie est directement appréciable via la différence de prévalence entre les chiens vivant en intérieur (23,5%) et ceux vivant en extérieur (43,3%) (**Figure 38**). Cependant, comme précédemment énoncé (Partie 2.III.3.c), ce facteur est en lien avec d'autres tels que la race et le sexe. Ces derniers peuvent également constituer des facteurs de risques.

Le niveau « Extérieur » a été défini comme référence lors de l'exécution du script R. L'*odd ratio* calculé est de 2.024 avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0.222 et 21.169. L'intervalle de confiance obtenu contenant la valeur 1, il est impossible de conclure. Le risque associé à ce facteur est inconnu. Similairement aux facteurs « Race » et « Âge », une différence a été observée entre les chiens d'intérieur et d'extérieur lors de la construction des graphiques de la partie précédente. L'absence de résultat interprétable à l'issue des tests statistiques peut être expliquée par un nombre d'individus insuffisant.

4. Résultats de la PCR en temps réel

Sur les 79 extraits d'ADN analysés, une fluorescence mesurable est apparue pour cinq échantillons. Ceux-ci ont présenté des « *cycle threshold* » (Ct) compris entre 34,49 et 37,05. Les courbes de fusion de chaque extrait ont été réalisées. Les 5 échantillons ont présenté une Tm de 75,5°C. La positivité est donc en faveur d'une infestation à *D. immitis* (température de fusion de 75.7 ± 0.3 °C) (**Figure 39**).

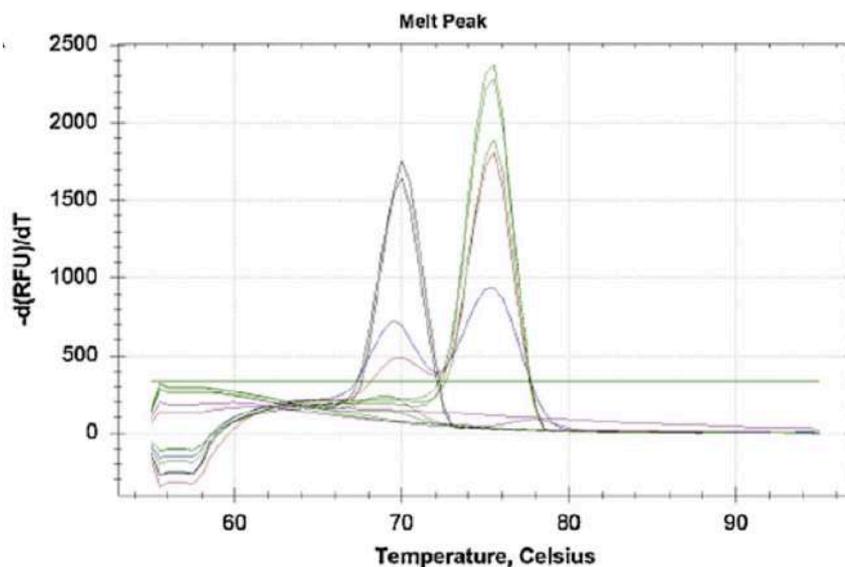


Figure 39 : Courbe de fusion de D. immitis et D. repens. La température de fusion de D. immitis apparait à l'abscisse du maximum de la courbe verte. Dans le cas de D. repens, il s'agit de la courbe noire (Latrofa et al. 2012)

5. Synthèse des résultats

Au total, 30 chiens sur les 77 ont été testés positifs à la présence d'antigènes parasitaires. Cinq individus parmi les 30 ont également été testés positifs à *D. immitis* par qPCR.

Si l'on considère les résultats du test antigénique, la prévalence de la maladie dans la population étudiée est de 39%. Lorsque l'on se fie aux résultats obtenus par qPCR, la prévalence de la maladie est alors de 6%.

L'analyse statistique menée a permis de définir la non-médicalisation des chiens du territoire comme étant un facteur de risque de positivité au test diagnostique et donc d'infestation par *D. immitis*. Ces résultats vont dans le sens de ceux issus de deux études de 2021 et 2022 démontrant l'absence d'association entre les facteurs âge, sexe, race, couleur du pelage et la positivité aux tests diagnostiques de *D. immitis*. Ils ont cependant mis en évidence une association entre la zone d'habitation, les habitudes concernant les traitements antiparasitaires chez les chiens et leur résultat au test (Selim et al. 2021; Sebolt et al. 2022). Cela conforte le résultat de notre étude statistique déterminant l'absence de médicalisation comme un facteur de risque. Le facteur « Médicalisation » considéré dans notre étude prend en compte à la fois le recours à un protocole de vaccination récent (il y a moins de 18 mois) et à une chimioprophylaxie contre *D. immitis* régulière mais hors recommandations de l'AHS. La prise en compte de ces nombreuses facettes de la médecine préventive permet d'inclure au sein de

l'échantillon des individus « Médicalisés », des animaux dont le suivi vétérinaire est réalisé régulièrement. En effet, un suivi régulier par le vétérinaire traitant assure non seulement une meilleure observance des traitements préventifs de la maladie mais permet également une détection précoce des signes cliniques de la dirofilariose cardiopulmonaire.

En résumé, les principales caractéristiques de la population de chiens positifs à la dirofilariose par sérologie dans notre étude sont :

- > 6 ans – pour la moitié de la population
- Grande race : 87% des chiens
- Non médicalisés : 93% des chiens
- Mode de vie en extérieur : 87% des chiens

Pour les animaux positifs en sérologie, nous avons observé des signes cliniques compatibles avec la dirofilariose cardiopulmonaire chez 7 chiens sur 30. Les principaux signes étaient les suivants :

- 2 chiens : toux, amaigrissement, intolérance à l'effort (classe II de la dirofilariose cardiopulmonaire)
- 4 chiens : amaigrissement, anorexie, souffle cardiaque, muqueuses pâles, dyspnée, œdème pulmonaire, ascite (classe III de la dirofilariose)
- 1 chien : crises convulsives (forme atypique neurologique de la dirofilariose)

IV. Discussion

1. Population canine et modalités de prélèvement

a. Échantillonnage de la population

i. Âge des individus prélevés

Les critères d'inclusion des chiens de notre étude incluent un seuil d'âge établi à un an. L'exclusion des chiens de moins d'un an permet de s'affranchir, dans le cas du test sérologique, de certains faux négatifs pour lesquels l'animal serait infesté mais encore durant la période

précédant la libération des antigènes parasitaires et des microfilaires dans la circulation sanguine (5 à 7 mois après l'infestation).

Cependant, la mise en place d'un seuil d'âge a également conduit à une diminution de l'échantillon de chiens aptes à être inclus dans l'étude. En effet, de nombreux chiens âgés de 6 à 12 mois sont présentés en consultation de médecine préventive pour la mise en place d'une prévention médicale de la dirofilariose cardiopulmonaire. Ces chiens, lorsqu'ils ne reçoivent pas de prophylaxie, sont eux aussi soumis à l'infestation via les moustiques. Ils peuvent ainsi être porteurs de *D. immitis* à un stade immature ou adulte et sont donc détectables par la PCR.

ii. Aire de prélèvements

Sur l'ensemble des structures contactées (n = 20), uniquement deux ont participé à la récolte des échantillons sanguins. Ainsi, les 79 échantillons proviennent uniquement de quatre aires de prélèvement différentes dont trois localisées dans le Grand Nouméa (**Figure 40**). Le « Grand Nouméa » correspond à l'agglomération de Nouméa. Il regroupe 67,2% de la population en 2019 et s'étend sur une superficie correspondant à 9% du territoire (Rivoilan 2020). La population canine évoluant conjointement à la population humaine, sa majeure partie se concentre dans cette zone. C'est également dans le Grand Nouméa que se trouve la plus grande proportion de chiens médicalisés.

Un seul chien de l'étude ne vit pas au sein du Grand Nouméa. Il a été prélevé dans la commune de Touho, en Province Nord, en « Brousse » (**Figure 40**). La « Brousse » calédonienne se définit comme l'ensemble des espaces ruraux du territoire. Les densités de populations canines et humaines y sont beaucoup plus faibles qu'au sein du Grand Nouméa. Les chiens de Brousse sont pour la plupart utilisés comme chiens de travail dans les élevages bovins, chiens de chasse ou bien vivent en liberté au sein des tribus kanaks. Ils sont donc considérés comme semi-sauvages (Beugnet, Bima-Blum, Chardonnet 1993). Les différences de mode de vie des individus (lieu de vie, médicalisation, utilisation, ...) expliquent les différences de prévalence obtenues au cours de l'étude de Beugnet, Bima-Blum et Chardonnet (1993) : 53,6% sur le Grand Nouméa contre 62,71% en Brousse.

Dans notre étude, compte tenu du faible nombre d'individus prélevés hors du Grand Nouméa et donc du manque de représentativité de notre population, il est possible que la prévalence évaluée sous-estime la prévalence réelle de la maladie en Nouvelle-Calédonie.



Figure 40 : Carte du territoire néo-calédonien répertoriant le nombre de chiens prélevés en fonction de la zone de prélèvement

iii. Prélèvements en structure vétérinaire

De nombreux cabinets et cliniques vétérinaires ont été contactés afin de participer au travail de prélèvement de cette étude. De plus, trois associations de protection animalière ont également été contactées par mail dont deux n'ayant pas répondu à nos sollicitations et l'une ayant refusé la participation. De ce fait, la population canine de l'étude est en grande majorité constituée de chiens de propriétaires. Seuls les échantillons récoltés par la Clinique vétérinaire de la Promenade (représentant 6% des prélèvements) font exception puisqu'il s'agit de chiens errants capturés par différentes associations de protection animale et présentés en consultation vétérinaire pour bilan de santé. Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude pourraient présenter un biais d'échantillonnage corrélé à la difficulté de réaliser des prélèvements auprès de refuges. De plus, les difficultés rencontrées lors de la réalisation des prélèvements a conduit à l'obtention de 79 échantillons uniquement. Le nombre d'échantillons analysés est donc relativement faible dans le cadre de l'obtention d'une prévalence.

iv. Médicalisation des chiens prélevés

Concernant les prélèvements réalisés sur les chiens errants, les antécédents médicaux et le recours à des méthodes de chimioprophylaxie ne sont pas connus. Il a cependant été évoqué précédemment que l'utilisation occasionnelle de molécules prophylactiques ne présente qu'un effet microfilaricide. Dans notre cas, l'administration aux chiens prélevés de sélamectine, moxidectine ou milbémycine oxime par voie orale n'a donc qu'un effet de diminution de la microfilarémie, sans conséquence sur les résultats des tests sérologiques et moléculaires. Les individus dont l'administration de molécules efficaces contre les microfilaires est irrégulière ont donc pu être intégrés à la population sans biaiser les résultats des tests diagnostiques.

b. Modalités de prélèvement

Le site de prélèvement (veine jugulaire, veine saphène, veine céphalique), le matériel utilisé ainsi que l'heure de prélèvement n'ont pas été imposés aux vétérinaires. Des différences de sensibilité ont été observées concernant les méthodes directes de recherche des microfilaires entre le sang capillaire périphérique et le sang veineux périphérique (Păstrav et al. 2018). Cependant, aucune étude n'a démontré une influence du site de prélèvement veineux sur la microfilarémie apparente de l'échantillon sanguin. De plus, il existe des variations nyctémérales et saisonnières de la microfilarémie (Ionică et al. 2017). Ces variations n'influencent nullement les résultats de nos tests diagnostiques, l'un se basant uniquement sur la détection d'antigènes et l'autre présentant une sensibilité élevée. Ainsi, il est fort probablement que les prélèvements sanguins aient été réalisés à différents moments de la journée mais ce paramètre ne nécessite pas d'être pris en compte dans notre étude.

c. Transport et conservation des prélèvements sanguins

Au cours de ce travail de thèse, la conservation des échantillons depuis leur prélèvement jusqu'à leur exploitation a été source de questionnement. En effet, l'ensemble des prélèvements a subi un long trajet depuis la Nouvelle-Calédonie par voie aérienne.

i. Transport et conservation du sérum

Pour une partie des chiens présentés en consultation, un échantillon sanguin sur tube sec a été prélevé. Les cliniques et cabinets vétérinaires sollicités ne possédant pas de centrifugeuse, les tubes ont été laissés à décanter à température ambiante jusqu'à obtention d'un sérum translucide. Ce mode d'obtention du sérum pourrait expliquer l'aspect légèrement rougeâtre, semblable à un sérum hémolysé, de certains échantillons.

Du fait des délais de transport imposés par l'éloignement géographique entre le lieu de prélèvement et le lieu d'analyse, les produits ont par la suite été congelés à -20°C et ce jusqu'au transport aérien. En préparation du voyage en soute, les tubes de sérum et de sang ont été placés dans un contenant isotherme avec un pain de glace. De plus, la température au sein de la soute des avions commerciaux est variable dans l'espace mais aussi au cours du temps. Les compagnies aériennes s'accordent cependant sur des températures moyennes comprises entre 10 et 15,5°C pour une minimale de température à 7°C (Air Canada 2020). Les échantillons ont ainsi pu subir une décongélation au cours de cette phase. Une fois sur le sol métropolitain, ils ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Selon la notice détaillée du test *Dirofilariose canine*[®], du sérum ou du plasma congelé peut être utilisé pour la réalisation, sans information supplémentaire concernant la température ou la durée de congélation maximale recommandée. Ainsi, les analyses sérologiques ont été réalisées conformément aux instructions du fabricant.

ii. Conservation du sang sur EDTA

L'obtention de sérum n'a pas été possible pour trois des individus inclus dans l'étude. Ainsi, la réalisation des tests de diagnostic sérologique pour ces individus a reposé sur l'utilisation d'échantillons de sang total sur EDTA ayant subi les mêmes conditions de conservation que précédemment décrites (cf. Partie 2.IV.1.c.i.). Les prélèvements de sang total sur EDTA ont également été utilisés au cours du processus d'extraction d'ADN.

2. Méthode sérologique de détection des antigènes parasitaires de *D. immitis*

a. Choix de la méthode

La grande majorité des tests commercialisés en France reposent sur la technique de l'immunochromatographie. Les tests rapides de détection des antigènes parasitaires sont privilégiés en pratique courante pour leur facilité d'accès, leur aisance d'utilisation et leur rapidité d'exécution. Néanmoins, ils constituent également des tests avec de bonnes sensibilité et spécificité (respectivement > 94% et 100%).

Notre choix s'est porté sur le test Dirofilariose canine[®] du laboratoire KITVIA pour sa facilité d'accès (délai d'envoi court) et pour son prix faible comparativement à d'autres tests rapides disponibles sur le marché. En effet, en 2018, le prix unitaire des tests Dirofilariose canine[®] était de 8,31€. En comparaison, l'ensemble des autres tests disponibles sur le marché présentait un prix unitaire variant de 11,66€ à 15,40€ pour le Snap 4DX Plus[®] (Dauphin 2018).

De plus, sa notice détaillée n'indique pas de contre-indication d'utilisation de sang total congelé bien qu'elle ne fasse pas mention de sa possible utilisation.

Néanmoins, le test de KITVIA présente une sensibilité de 94,4% ce qui fait de ce test, le test rapide de détection des antigènes de *D. immitis* le moins sensible (à l'exception du Snap Dirofilaria[®] quantitatif d>IDEXX). La sensibilité correspond à la probabilité que le test soit positif sachant que l'individu est malade. Dans notre cas, c'est la probabilité que le test soit positif sachant que le chien est parasité par des filaires de *D. immitis*. Ainsi, plus la sensibilité d'un test est éloignée de 100%, plus nous nous exposons à l'obtention de faux négatifs. Par conséquent, la sensibilité du snap-test choisi induit probablement une sous-estimation de la prévalence de la maladie, obtenue par diagnostic sérologique. Cependant, ces résultats étant voués à être confrontés avec les résultats de la méthode moléculaire, nous avons tout de même choisi de maintenir l'utilisation des tests KITVIA.

b. Limites de l'interprétation

i. Cycles de congélation-décongélation

Comme précédemment évoqué, nous avons majoritairement utilisé du sérum congelé. Cependant, ce sérum au cours du transport a pu subir des phases de décongélation. A priori ces phases ont été sans conséquence sur le bon déroulement des tests mais il reste difficile d'évaluer leur conséquence sur les résultats obtenus. De manière générale, les protéines sont sensibles aux cycles de congélation-décongélation. Ainsi, leur alternance a pu altérer en partie les glycoprotéines mises en évidence, pouvant mener à l'apparition de faux négatifs.

ii. Qualité des sérums et du sang total EDTA

Les difficultés matérielles rencontrées sur le territoire (absence de centrifugeuse en structure vétérinaire) ont compliqué l'obtention de sérums de bonne qualité. Trois des individus inclus dans l'étude n'ont ainsi fourni qu'un échantillon de sang total pour analyse. Trois tests sérologiques ont donc été réalisés à partir de sang total sur EDTA. L'utilisation de sang total

sur EDTA congelé n'est pas décrite dans la notice détaillée des tests KITVIA utilisés. La réalisation des tests sérologiques à partir d'échantillons de ce type a toutefois été décrite dans la thèse de doctorat vétérinaire de Julie Semat (2016). Au cours de son travail en laboratoire, l'analyse sérologique a été effectuée à l'aide de snap-tests 4DX Plus® d'IDEXX dont la notice ne décrit également pas l'utilisation de sang total sur EDTA congelé. Les résultats obtenus au cours de son travail de thèse ne montrant aucune aberration, nous avons par conséquent choisi pour ces trois individus de réaliser la sérologie à partir de sang total sur EDTA congelé dont nous disposions. Un seul de ces tests a pu être mené en totalité et a fourni un résultat interprétable. L'obtention de ce résultat a cependant nécessité un temps de migration au-delà des 10 minutes maximales conseillées par la notice du produit. Pour les deux autres, aucune migration ne s'est produite malgré les tentatives de changement de tube EDTA et d'homogénéisation. De ce fait, aucun résultat sérologique n'a été obtenu pour ces deux individus. Cette absence de migration pourrait s'expliquer par l'ancienneté des prélèvements. Le sang présentait une viscosité supérieure à celle attendue, des caillots sanguins étant même présents dans les tubes.

Deuxièmement, l'absence de centrifugeuse a mené à l'obtention d'échantillons de sérum d'apparence parfois hémolysés. Or, il est précisé dans la notice du test *Dirofilariose canine*® que les échantillons de plasma ou de sérum hémolysés peuvent donner des résultats incorrects. Les résultats des tests sérologiques ont pu être biaisés par la méthode d'obtention du sérum.

iii. Existence de faux-négatifs

Comme présenté dans la Partie 1.V.3.c.ii, les caractéristiques du test mènent parfois à l'obtention de faux-négatifs. Ces tests disposent d'un seuil de détection variant entre 1 à 5 femelles adultes. Le seuil exact n'est pas renseigné sur la fiche produit du *Dirofilariose canine*®. Ainsi, un animal présentant un nombre de femelles adultes faible peut avoir un taux d'antigènes circulant insuffisant pour positiver le test sérologique. De la même façon, en cas d'infestation unisexe, de destruction des antigènes parasites via le système immunitaire ou bien de prélèvement avant excrétion des antigènes, les tests rapides sont faussement négatifs.

3. Extraction d'ADN

i. Limites de réalisation

Les extractions d'ADN ont été réalisées au laboratoire de Parasitologie de l'ENVT à partir d'échantillons de sang total sur EDTA. Aucune contre-indication à la congélation des échantillons n'est reportée dans la notice détaillée du NucleoSpin® Tissue.

Pour de nombreux échantillons, plusieurs mois se sont écoulés entre le prélèvement et l'extraction. En ce sens, un certain nombre de ceux-ci présentaient après décongélation une viscosité supérieure à celle attendue. De plus, des caillots sanguins ont parfois pu être observés. Dans un souci d'homogénéisation des échantillons, chacun a été vortexé vigoureusement avant le début du protocole d'extraction. Malgré les mesures de précaution mises en place, une grande partie d'échantillons ont généré une obstruction des colonnes de migration en raison des caillots. Les colonnes apparaissaient alors bouchées par du matériel d'origine sanguine empêchant le passage de la solution située en amont. Cela a nécessité une augmentation du temps ou de la vitesse de centrifugation pour assurer le bon déroulement de la procédure. D'après la notice d'utilisation du kit d'extraction, ce phénomène pourrait être expliqué par :

- L'ajout de plus d'échantillon que nécessaire (principalement lors d'utilisation de tissu ou de matériel insoluble).
- Une lyse incomplète par :
 - o Défaut d'homogénéisation du mélange après ajout du Buffer T1 et de la Protéinase K.
 - o Perte d'activité de la Protéinase K (par mauvais stockage par exemple).
- Une mauvaise préparation des réactifs (Buffer B5 et Protéinase K).

Dans notre cas, l'ensemble des réactifs ont été préparés en respectant scrupuleusement les protocoles décrits. De plus, la Protéinase K a été stockée au congélateur à -20°C selon les recommandations. Elle n'a été placée à température ambiante que lors de l'ajout de la solution de lyse, puis replacée au congélateur pour le reste des manipulations.

Pour finir, après ajout du Buffer T1 et de la Protéinase K, chaque échantillon a été homogénéisé vigoureusement à l'aide d'un agitateur Vortex pendant 15 à 20 secondes (10 à 20 secondes recommandées sur la notice). Ainsi, la mauvaise qualité de certains échantillons sanguins utilisés pourrait être à l'origine des anomalies de migration rencontrées.

4. Méthode moléculaire de détection de l'ADN parasitaire de *Dirofilaria immitis* : PCR duplex

a. Choix de la méthode

La qPCR duplex mise en œuvre rend possible la détection et la différenciation des filaires et adultes de *D. immitis* et de *D. repens*. Cette méthode permet de s'affranchir des faux négatifs causés par des infestations amicrofilarémiques (Latrofa et al. 2012). C'est une méthode hautement sensible. Les limites de détection sont de 2,5 pg/μL (soit $3,2 \times 10^{-5}$ microfilaire/4μL) pour les filaires de *D. immitis*, et de 3×10^{-3} pg/μL pour les adultes. Cependant, en comparaison du diagnostic sérologique à l'aide de Snap test 4DX[®], la PCR a démontré une sensibilité moindre (Semat 2016).

b. Limites d'interprétation

i. Qualité des échantillons d'ADN

Comme dit précédemment, les échantillons d'ADN utilisés lors de la PCR ont été obtenus par extraction à partir de sang total sur EDTA congelé. De nombreuses précautions afin d'éviter toute contamination ont été prises : port de gants stériles en latex, port d'une blouse, nettoyage soigneux des paillasses, ...

Similairement et comme présenté dans le paragraphe Partie 2.IV.3.i., les problèmes de migration rencontrés durant l'extraction ont pu être à l'origine d'échantillons d'ADN de mauvaise qualité. Si l'extraction d'ADN n'a pas fonctionné, le résultat de la PCR pour l'échantillon considéré peut revenir faussement négatif. Chacun des résultats de la PCR doit être confronté au résultat du test rapide associé afin d'infirmer ou de confirmer la suspicion d'infestation à *D. immitis*. Cependant, la méthode sérologique ne présentant pas une sensibilité parfaite, l'existence de faux négatifs à l'issue de la comparaison reste possible.

ii. Existence de faux négatifs

Parmi les 79 extraits d'ADN ayant subi une PCR, cinq sont revenus positifs à une infestation à *D. immitis*. Ces cinq chiens ont également présenté un test antigénique positif. Au total, 25 individus ont été testés positifs aux antigènes parasitaires mais négatifs à la détection de l'ADN parasitaire.

Nous discutons ci-dessous des raisons qui auraient pu conduire à des résultats faux négatifs lors de la réalisation de la PCR, des faux positifs par sérologie (spécificité de 100% du test) semblant moins probables.

- *Qualité de l'extraction de l'ADN*

Comme expliqué précédemment, des soucis de coagulation dans les colonnes d'extraction ont été observés lors des phases de lavage. Des résidus d'hémoglobine se sont donc retrouvés dans certains produits d'extraction finaux. Ces résidus d'hémoglobine, à l'instar d'autres substances qui seront détaillées ci-dessous, peuvent constituer des inhibiteurs de la PCR.

Afin de vérifier la qualité de l'extraction de l'ADN, un témoin positif à l'ADN de chien aurait pu être ajouté à la plaque de PCR. À l'issue de la réaction, la présence d'un amplicon dont la T_m correspond à l'ADN de chien pour l'ensemble des échantillons, confirme la qualité des produits d'extraction utilisés.

Nous aurions également pu réaliser un dosage de la quantité d'ADN présente dans chaque échantillon.

- *Présence d'inhibiteurs de la réaction*

En plus des résidus d'hémoglobine, la réaction a pu être perturbée par certaines protéines et agents chaotropiques comme le chlorure de guanidinium utilisé lors du protocole d'extraction. Ces composés sont des inhibiteurs de la PCR (Schrader et al. 2012). Ils sont normalement éliminés par les nombreux rinçages au cours de l'extraction. Dans notre cas, les anomalies rencontrées à l'occasion des rinçages ont pu entraîner une mauvaise élimination de ces composés. Les inhibiteurs de la PCR ont ainsi pu se retrouver en quantité non négligeable dans les extraits d'ADN.

- *Absence de dilution*

L'ADN en lui-même est également inhibiteur de la réaction de PCR. Chaque analyse n'a été réalisée qu'une seule fois, sans dilution des échantillons au préalable. Afin de confirmer la négativité du test, réitérer les analyses après dilution des extraits d'ADN aurait été intéressant. En effet, il est possible pour certains échantillons, trop riches en ADN, que la réaction de PCR ait été inhibée, conduisant à un résultat faussement négatif.

5. Concordance entre la clinique et la positivité aux tests

Parmi les 14 chiens inclus dans l'étude ayant présenté au moment du prélèvement des signes cliniques compatibles avec la dirofilariose cardiopulmonaire, seulement sept ont réellement été testés positifs par sérologie. En effet, ont été considérés comme évocateurs d'une dirofilariose cardiopulmonaire : des épisodes de toux, une intolérance à l'effort et la présence d'un souffle cardiaque. Ces signes cliniques correspondent néanmoins à une insuffisance cardiaque pouvant avoir de nombreuses étiologies. Les maladies cardiaques concernent environ 10% de l'ensemble des chiens présentés en structure vétérinaire (Atkins 2009). La prévalence atteint plus de 60% chez les chiens âgés (Rush 2002). Les principales pathologies à l'origine de l'insuffisance cardiaque chez les chiens sont les valvulopathies et les cardiomyopathies. Ainsi, sur les 7 présentant des signes cliniques compatibles avec la dirofilariose et ayant été testés négatifs par sérologie, 6 chiens sont âgés de plus de 8 ans. La présence de ces signes évocateurs peut donc être liée à l'existence d'une pathologie cardiaque indépendante de la dirofilariose.

6. Intérêts et perspectives

Notre étude a permis de contribuer à l'estimation de la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire chez le chien à 39% en Nouvelle-Calédonie, et à apporter des informations actualisées sur cette parasitose sur ce territoire ultra-marin. La prévalence de 39% obtenue dans ce travail est en deçà de celle obtenue lors du travail mené en 1993 (Beugnet, Bima-Blum, Chardonnet 1993). Cependant, elle est du même ordre de grandeur que la prévalence établie auprès des chiens de propriétaires (38,6%) dans la même étude. Notre population est elle aussi majoritairement constituée de chiens non errants. Il semble donc que la prévalence de la pathologie ne tende pas à diminuer. Afin de mieux appréhender la gestion de la pathologie par les vétérinaires néo-calédoniens, un questionnaire a été créé en partenariat avec le GTV de Nouvelle-Calédonie (**Annexe 6**). Les réponses obtenues ont été utilisées pour la rédaction des paragraphes concernant les spécificités de la prévention, du diagnostic et du traitement de la dirofilariose en Nouvelle-Calédonie (**Annexe 7**). Elles serviront également au GTV à mieux connaître les pratiques de chacun et ainsi homogénéiser les prises en charge avec les *guidelines* déjà établies.

Conclusion

La Nouvelle-Calédonie est un archipel localisé en Océanie. C'est un territoire français à 16 732 km de la Métropole. La Nouvelle-Calédonie bénéficie d'un climat tropical tempéré avec des températures clémentes tout au long de l'année et un taux d'humidité important.

En 1993, la prévalence estimée de la dirofilariose cardiopulmonaire chez les chiens néo-calédoniens était de 57% (Beugnet, Bima-Blum, Chardonnet 1993). Actuellement, il s'agit de la maladie vectorielle la plus importante chez les chiens sur le territoire. La pathologie est causée par *Dirofilaria immitis*. Les chiens jouent le rôle d'hôtes définitifs mais également de réservoir. Ils s'infestent via la piqûre d'un moustique porteur de larves de *D. immitis*. La larve infestante, après inoculation, poursuit son cycle dans l'organisme du canidé. Les filaires adultes, logées dans les artères pulmonaires et le cœur droit, libèrent des microfaires dans la circulation sanguine. La présence des parasites conduit à l'apparition d'une hypertension pulmonaire et d'une insuffisance cardiaque droite. Le pronostic vital de l'animal peut être engagé lors de l'évolution de la maladie.

La prévention de la dirofilariose cardiopulmonaire représente une part importante de la médecine préventive en Nouvelle-Calédonie. Notre travail a permis de mettre en évidence que la plupart des praticiens étaient sensibilisés à la prophylaxie et la proposaient systématiquement lors des consultations de médecine préventive. Cette prophylaxie repose en général sur l'administration semestrielle ou annuelle, de lactones macrocycliques longue action par voie parentérale. L'utilisation de spécialités par voie topique ou orale reste minoritaire sur l'ensemble du territoire.

Le second axe de lutte contre la maladie repose sur son diagnostic et son traitement. Le traitement adulticide, bien que laborieux et coûteux, permet une élimination totale du parasite dans la majorité des cas. Il est couplé à l'administration de lactones macrocycliques à action microfilaricide et à une antibiothérapie (doxycycline). À cela, les vétérinaires ajoutent quasi-systématiquement une corticothérapie et de manière occasionnelle, de l'aspirine. En général, les protocoles utilisés par les praticiens diffèrent selon la présentation clinique de l'animal reçu en consultation (deux ou trois injections). Lorsque l'état de l'animal est critique ou lorsque les moyens économiques des propriétaires sont limités, certains vétérinaires ont recours à des traitements dits « slow kill » par administration mensuelle de lactones macrocycliques.

En Nouvelle-Calédonie, le diagnostic repose sur la détection d'antigènes parasitaires et sur la détection de microfaires circulantes. Bien que près de 38% des vétérinaires utilisent systématiquement les deux méthodes en association, près de 38% également affirment

n'utiliser que le test rapide. Concernant le quart de praticiens restants, les méthodes diagnostiques utilisées sont adaptées à la clientèle rencontrée, bien souvent par souci d'économie.

La persistance d'une population importante de chiens errants et/ou non médicalisés crée un réservoir durable pour *D. immitis*. Ces chiens ne recevant aucune chimioprévention sont donc fortement à risque d'être infestés.

La partie expérimentale de ce travail de thèse a consisté en la réalisation de prélèvements sanguins en structures vétérinaires, en Nouvelle-Calédonie. Ces prélèvements ont par la suite été testés selon deux procédés : la détection d'antigènes parasitaires et la détection d'ADN parasitaire de *D. immitis*.

Soixante-dix-neuf prélèvements ont été analysés. Sur l'ensemble des échantillons, 30 se sont révélés positifs à la détection d'antigènes parasitaires. Parmi ces 30 individus, 5 ont également présenté une PCR positive à la présence d'ADN de *D. immitis*. En considérant les résultats du test antigénique, la prévalence de la maladie auprès des chiens de Nouvelle-Calédonie estimée dans notre étude est de 39%. Ce taux est relativement élevé ; il est également important de souligner que notre échantillon était constitué majoritairement de chiens de propriétaires habitant dans le Grand Nouméa, ce qui laisse supposer une prévalence bien plus importante au sein de la population de chiens errants du territoire. La prévalence estimée dans notre étude à partir des résultats sérologiques s'apparente ainsi plutôt à la prévalence de la maladie dans la population des chiens de propriétaires dans l'agglomération de Nouméa, qu'à une prévalence globale.

La dirofilariose cardiopulmonaire reste donc une pathologie importante en termes de fréquence chez les chiens néo-calédoniens, malgré les efforts effectués par les praticiens depuis de nombreuses années concernant sa prévention. Il est donc nécessaire de continuer l'effort d'informations et d'« éducation » des propriétaires en termes de prévention, mais également de sensibiliser les pouvoirs publics sur la prise en charge globale de cette parasitose zoonotique.

Bibliographie

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY, 2014. *Recommandations actuelles pour la prévention, le diagnostic et la gestion de la dirofilariose cardiaque* [en ligne]. 2014.

AMES, Marisa K. et ATKINS, Clarke E., 2020. Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Veterinary Parasitology*. 1 juillet 2020. Vol. 283, pp. 109131. DOI 10.1016/j.vetpar.2020.109131.

AMES, Marisa K., VANVRANKEN, Philip, EVANS, Chelsea et ATKINS, Clarke E., 2020. Non-Arsenical heartworm adulticidal therapy using topical moxidectin-imidacloprid and doxycycline: A prospective case series. *Veterinary Parasitology*. juin 2020. Vol. 282, pp. 109099. DOI 10.1016/j.vetpar.2020.109099.

AROCH, Itamar, ROJAS, Alicia, SLON, Paul, LAVY, Eran, SEGEV, Gilad et BANETH, Gad, 2015. Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Veterinary Parasitology*. juillet 2015. Vol. 211, n° 3-4, pp. 303-305. DOI 10.1016/j.vetpar.2015.06.010.

ATKINS, C., BONAGURA, J., ETTINGER, S., FOX, P., GORDON, S., HAGGSTROM, J., HAMLIN, R., KEENE, B., LUIS-FUENTES, V. et STEPIEN, R., 2009. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Canine Chronic Valvular Heart Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. novembre 2009. Vol. 23, n° 6, pp. 1142-1150. DOI 10.1111/j.1939-1676.2009.0392.x.

AYKUR, Mehmet, YAĞCI, Ayşe, SIMŞEK, Sami, PALAMAR, Melis, YAMAN, Banu, KORKMAZ, Metin et DAGCI, Hande, 2021. First time identification of subconjunctival *Dirofilaria immitis* in Turkey: giant episcleral granuloma mimicking scleritis. *Parasitology Research*. novembre 2021. Vol. 120, n° 11, pp. 3909-3914. DOI 10.1007/s00436-021-07317-2.

BANDI, Claudio, TREES, Alexander J et BRATTIG, Norbert W, 2001. Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary Parasitology*. juillet 2001. Vol. 98, n° 1-3, pp. 215-238. DOI 10.1016/S0304-4017(01)00432-0.

BEASLEY, Michaela J., HIEBERT, Elizabeth C., ALCOTT, Cody, JEFFERY, Nicholas, LAFOON-JONES, Brooklynn et GAMBINO, Jennifer M., 2021. Verminous myelopathy secondary to aberrant *Dirofilaria immitis* migrans was detected in the cervical subarachnoid space of four dogs using MRI and CT. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. mai 2021. Vol. 62, n° 3, pp. 299-308. DOI 10.1111/vru.12954.

BÉNÉ, Marie-Christine, DROUET, Christian, FISSON, Sylvain, SEILLÈS, Estelle, et COLLÈGE DES ENSEIGNANTS D'IMMUNOLOGIE, 2014. *Méthodes en immunologie: des principes aux bonnes applications*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson. ISBN 978-2-294-74022-0. 577.27 MET, 2 177 498

BEUGNET, F., BIMA-BLUM, S. et CHARDONNET, L., 1993. Etude épidémiologique de la dirofilariose cardiaque du chien en Nouvelle-Calédonie : Choix d'une méthode diagnostique. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 1993. Vol. 144, n° 11, pp. 891-897.

BEUGNET, Frédéric, BOURDOISEAU, Gilles et DANG, Hoan, 2004. *Abrégé de parasitologie clinique des carnivores domestiques: Parasitoses digestives*. Clichy, France : Kalianxis. ISBN 978-2-915758-01-6.

BEUGNET, Frederic, HALOS, Lénaïg et GUILLOT, Jacques, 2018. *Textbook of clinical parasitology in dogs and cats*. ISBN 978-2-9550805-2-8.

BOUCHERY, T., LEFOULON, E., KARADJIAN, G., NIEGUISILA, A. et MARTIN, C., 2013. The symbiotic role of Wolbachia in Onchocercidae and its impact on filariasis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013. Vol. 19, n° 2, pp. 131-140. DOI 10.1111/1469-0691.12069.

BOURDOISEAU, Gilles, 2000. *La dirofilariose cardiopulmonaire et l'angiostrongylose cardiopulmonaire*. Nouvelles Editions Vétérinaires et Alimentaires. Parasitologie clinique du chien.

BOWMAN, Dwight D. et ATKINS, Clarke E., 2009. Heartworm Biology, Treatment, and Control. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. novembre 2009. Vol. 39, n° 6, pp. 1127-1158. DOI 10.1016/j.cvsm.2009.06.003.

BOWMAN, Dwight D. et MANNELLA, Claire, 2011. Macrocyclic Lactones and *Dirofilaria immitis* Microfilariae. *Topics in Companion Animal Medicine*. novembre 2011. Vol. 26, n° 4, pp. 160-172. DOI 10.1053/j.tcam.2011.07.001.

CALEDONIA, 2022. [en ligne]. [Consulté le 11 mai 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.youtube.com/watch?v=GcA2LhREVns>

CALVERT, Clay A. et THOMASON, Justin David, 2008. Heartworm Disease. In : *Manual of Canine and Feline Cardiology* [en ligne]. Elsevier. pp. 183-199. [Consulté le 25 avril 2023]. ISBN 978-1-4160-2398-2. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416023982100105>

CARRETÓN, E., FALCÓN-CORDÓN, Y., RODON, J., MATOS, J.I., MORCHÓN, R. et MONTOYA-ALONSO, J.A., 2020. Evaluation of serum biomarkers and proteinuria for the early detection of renal damage in dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*). *Veterinary Parasitology*. juillet 2020. Vol. 283, pp. 109144. DOI 10.1016/j.vetpar.2020.109144.

CARRETÓN, E., MORCHÓN, R., FALCÓN-CORDÓN, Y., FALCÓN-CORDÓN, S., MATOS, J.I. et MONTOYA-ALONSO, J.A., 2020. Evaluation of different dosages of doxycycline during the adulticide treatment of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Veterinary Parasitology*. juillet 2020. Vol. 283, pp. 109141. DOI 10.1016/j.vetpar.2020.109141.

CASTRIC, Catherine, Anne, Françoise, 2002. *Mise au point sur le diagnostic et le traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire et de l'angiostrongylose canines*. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil.

CIUCA, Lavinia, VISMARRA, Alice, CONSTANZA, Dario, DI LORIA, Antonio, MEOMARTINO, Leonardo, CIARAMELLA, Paolo, CRINGOLI, Giuseppe, GENCHI, Marco, RINALDI, Laura et KRAMER, Laura, 2023. Efficacy of oral, topical and extended-release injectable formulations of moxidectin combined with doxycycline in *Dirofilaria immitis* naturally infected dogs. *Parasites & Vectors*. 6 février 2023. Vol. 16, n° 1, pp. 54. DOI 10.1186/s13071-023-05673-9.

CURTIS, Catriona, 2015. Canine heartworm – an ever-present threat. *Veterinary Nursing Journal*. 2 décembre 2015. Vol. 30, n° 12, pp. 345-350. DOI 10.1080/17415349.2015.1106928.

DAHMANI, Mustapha, TAHIR, Djamel, CABRE, Olivier, RAOULT, Didier, FENOLLAR, Florence, DAVOUST, Bernard et MEDIANNIKOV, Oleg, 2018. Prevalence of *Anaplasmataceae* and *Filariidae* species in unowned and military dogs in New Caledonia. *Veterinary Medicine and Science*. mai 2018. Vol. 4, n° 2, pp. 140-149. DOI 10.1002/vms3.97.

DANTAS-TORRES, F., LIA, R. P., BARBUTO, M., CASIRAGHI, M., CROVACE, A., CALIGIANI, L., GENCHI, C. et OTRANTO, D., 2009. Ocular dirofilariosis by *Dirofilaria immitis* in a dog: first case report from Europe. *Journal of Small Animal Practice*. décembre 2009. Vol. 50, n° 12, pp. 667-669. DOI 10.1111/j.1748-5827.2009.00846.x.

DAUPHIN, Clélia, 2018. *Sensibilité et spécificité des tests immunodiagnostiques rapides utilisés dans le cas de parasitoses et maladies vectorisées chez les carnivores domestiques : Revue systématique*. Lyon : Université Claude-Bernard - Lyon I.

DIGANGI, Brian A., DWORKIN, Carly, STULL, Jason W., O'QUIN, Jeanette, ELSER, Morgan, MARSH, Antoinette E., GROSHONG, Lesli, WOLFSON, Wendy, DUHON, Brandy, BROADDUS, Katie, GINGRICH, Elise N., SWINIARSKI, Emily et BERLINER, Elizabeth A., 2017. Impact of heat treatment on *Dirofilaria immitis* antigen detection in shelter dogs. *Parasites & Vectors*. 9 novembre 2017. Vol. 10, n° Suppl 2, pp. 483. DOI 10.1186/s13071-017-2443-7.

DILLON, R, BRAWNER, WR et HANRAHAN, L, 1995. Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dogs. *Proceedings of the '95 Heartworm Symposium, American Heartworm Society*. Batavia, 1995. pp. 113-120.

DOUCHEZ, Sarah, Eve, Lucie, 2017. *Études des interactions entre endosymbiotes et filaires : cas particulier de *Dirofilaria immitis* et conséquences thérapeutiques vis-à-vis de la dirofilariose cardio-pulmonaire du chien*. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil.

DRAKE, Jason, GRUNTMEIR, Jeff, MERRITT, Hannah, ALLEN, Lynn et LITTLE, Susan E., 2015. False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. *Parasites & Vectors*. 4 février 2015. Vol. 8, pp. 68. DOI 10.1186/s13071-015-0698-4.

DRAKOU, Katerina, NIKOLAOU, Thessalia, VASQUEZ, Marlen, PETRIC, Dusan, MICHAELAKIS, Antonios, KAPRANAS, Apostolos, PAPTAEODOULOU, Athina et KOLIOU, Maria, 2020. The Effect of Weather Variables on Mosquito Activity: A Snapshot of

the Main Point of Entry of Cyprus. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 21 février 2020. Vol. 17, n° 4, pp. 1403. DOI 10.3390/ijerph17041403.

DUCOS DE LAHITTE, J., 1990. Diagnostic des filarioses au laboratoire. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 1990. N° Numéro spécial, pp. 349-356.

DZIMIANSKI, MT, MCCALL, J.W. et MANSOUR, A.M., 2010. *The effect of prednisone on the efficacy of melarsomine dihydrochloride against adult Dirofilaria immitis in experimentally infected beagles*. Memphis, Tennessee. State of the Heartworm '10 Symposium, Memphis, TN.

ENGELMANN, A. M., SCHAFER, A. S., LHAMAS, C. L., DORNELLES, G. L., CARGNELUTTI, J. F., RAMOS, R. A. N., MONTEIRO, S. G. et ANDRADE, C. M., 2019. Morphological and molecular identification of *Acanthocheilonema reconditum* in a canine. *Comparative Clinical Pathology*. février 2019. Vol. 28, n° 1, pp. 271-274. DOI 10.1007/s00580-018-2859-2.

ERNST, J. et SLOCOMBE, J. O. D., 1983. Effect of low temperature on developing *Dirofilaria immitis* larvae in *Aedes triseriatus*. *Proceedings of the Heartworm Symposium '83 : Orlando, Florida, February 11-13, 1983 / managing editor, H.C. Morgan ; editor, G.F. Otto ; associate editors, R.F. Jackson, L.A. Jachowski, Jr., C.H. Courtney* [en ligne]. 1983. [Consulté le 11 mai 2023]. Disponible à l'adresse : https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=effect+of+low+temperature+on+developing+Dirofilaria+immitis+larvae+in+Aedes+tiseriatus&author=Ernst%2C+J.&publication_year=1983

ESCCAP, 2011. *Traitement et prévention des parasitoses des carnivores domestiques. Recommandations d'un groupe d'experts européens*. Guide de recommandations.

ESCCAP FRANCE, 2023. La dirofilariose cardiopulmonaire ou « maladie du ver du cœur ». *ESCCAP France* [en ligne]. 25 avril 2023. [Consulté le 25 avril 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/dirofilariose-filaires-ver-coeur.html>

EUZÉBY, J., 1990. Dirofilariose Canine. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 1990. N° Numéro spécial, pp. 283-291.

FALCÓN-CORDÓN, Y., TVARIJONAVICIUTE, A., MONTOYA-ALONSO, J. A., MUÑOZ-PRIETO, A., CARO-VADILLO, A. et CARRETÓN, E., 2022. Evaluation of acute phase proteins, adiponectin and endothelin-1 to determine vascular damage in dogs with heartworm disease (*Dirofilaria immitis*), before and after adulticide treatment. *Veterinary Parasitology*. 1 septembre 2022. Vol. 309, pp. 109759. DOI 10.1016/j.vetpar.2022.109759.

FONTES-SOUSA, A. P., SILVESTRE-FERREIRA, A. C., CARRETÓN, E., ESTEVES-GUIMARÃES, J., MAIA-ROCHA, C., OLIVEIRA, P., LOBO, L., MORCHÓN, R., ARAÚJO, F., SIMÓN, F. et MONTOYA-ALONSO, J. A., 2019. Exposure of humans to the zoonotic nematode *Dirofilaria immitis* in Northern Portugal. *Epidemiology and Infection*. 2019. Vol. 147, pp. e282. DOI 10.1017/S0950268819001687.

FUEHRER, Hans-Peter, AUER, Herbert, LESCHNIK, Michael, SILBERMAYR, Katja, DUSCHER, Georg et JOACHIM, Anja, 2016. *Dirofilaria* in Humans, Dogs, and Vectors in

Austria (1978–2014)—From Imported Pathogens to the Endemicity of *Dirofilaria repens*. BREHM, Klaus (éd.), *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 19 mai 2016. Vol. 10, n° 5, pp. e0004547. DOI 10.1371/journal.pntd.0004547.

GALVIS, Rodrigo De Lavallo et OVALLOS, David, 2020. Wolbachia Pipientis: Endosymbiont Bacteria of *Dirofilaria Immitis* and its Role in Feline *Dirofilariasis*. . 2020. Vol. 12, n° 2.

GENCHI, Claudio, MORTARINO, Michele, RINALDI, Laura, CRINGOLI, Giuseppe, TRALDI, Giorgio et GENCHI, Marco, 2011. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: The example of *Dirofilaria* in Europe. *Veterinary Parasitology*. mars 2011. Vol. 176, n° 4, pp. 295-299. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.01.012.

GENCHI, Marco, RINALDI, Laura, VENCO, Luigi, CRINGOLI, Giuseppe, VISMARRA, Alice et KRAMER, Laura, 2019. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: A questionnaire study in Italy. *Veterinary Parasitology*. mars 2019. Vol. 267, pp. 26-31. DOI 10.1016/j.vetpar.2019.01.014.

GRUNTMEIR, Jeff, LONG, Maureen, BLAGBURN, Byron et WALDEN, Heather, 2023. Improved Antigen Detection of Male-Only *Dirofilaria immitis* Infections in Canine Serum after Heat Treatment for Immune Complex Dissociation. *Parasitologia*. mars 2023. Vol. 3, n° 1, pp. 79-86. DOI 10.3390/parasitologia3010010.

Guidelines for the diagnosis, prevention and management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs., 2005. *Veterinary Parasitology*. Vol. 133, n° 2-3, pp. 255-266. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.07.008.

GUILLOT, Marie, 2008. *Aide au diagnostic par une étude comparative des principales parasitoses cardio-circulatoires et respiratoires des carnivores domestiques*. Thèse de doctorat vétérinaire. Université Claude-Bernard - Lyon I.

HAMPSHIRE, Victoria A., 2005. Evaluation of efficacy of heartworm preventive products at the FDA. *Veterinary Parasitology*. 24 octobre 2005. Vol. 133, n° 2, pp. 191-195. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.04.004.

HANSEN, Rowena D. E., TREES, Alexander J., BAH, Germanus S., HETZEL, Udo, MARTIN, Coralie, BAIN, Odile, TANYA, Vincent N. et MAKEPEACE, Benjamin L., 2011. A worm's best friend: recruitment of neutrophils by Wolbachia confounds eosinophil degranulation against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 7 août 2011. Vol. 278, n° 1716, pp. 2293-2302. DOI 10.1098/rspb.2010.2367.

HETTLICH, Bianca F., RYAN, Kirk, BERGMAN, Robert L., MARKS, Steven L., LEWIS, Barbara C., BAHR, Anne, COATES, Joan R., MANSELL, Joanne et BARTON, Claudia L., 2003. Neurologic complications after melarsomine dihydrochloride treatment for *Dirofilaria immitis* in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 novembre 2003. Vol. 223, n° 10, pp. 1456-1461. DOI 10.2460/javma.2003.223.1456.

IONICĂ, Angela Monica, MATEI, Ioana Adriana, D'AMICO, Gianluca, BEL, Lucia Victoria, DUMITRACHE, Mirabela Oana, MODRÝ, David et MIHALCA, Andrei Daniel, 2017.

Dirofilaria immitis and D. repens show circadian co-periodicity in naturally co-infected dogs. *Parasites & Vectors*. 28 février 2017. Vol. 10, n° 1, pp. 116. DOI 10.1186/s13071-017-2055-2.

JACQUES, Euzéby, 2005. *Dictionnaire de parasitologie médicale et vétérinaire*. Paris, Londres, New-York, Cachan : Tec [et] Doc. ISBN 978-2-7430-0705-8.

KENNEDY, M. et HARNETT, W. (éd.), 2001. *Parasitic nematodes : molecular biology, biochemistry, and immunology* [en ligne]. New York : CABI Pub. [Consulté le 14 mai 2023]. ISBN 978-0-85199-423-9. Disponible à l'adresse : <http://archive.org/details/parasiticnematod0000unse>

KRAMER, L., CROSARA, S., GNUDI, G., GENCHI, M., MANGIA, C., VIGLIETTI, A. et QUINTAVALLA, C., 2018. Wolbachia, doxycycline and macrocyclic lactones: New prospects in the treatment of canine heartworm disease. *Veterinary Parasitology*. 30 avril 2018. Vol. 254, pp. 95-97. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.03.005.

KRAMER, L., GRANDI, G., LEONI, M., PASSERI, B., MCCALL, J., GENCHI, C., MORTARINO, M. et BAZZOCCHI, C., 2008. Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Parasitology*. décembre 2008. Vol. 158, n° 3, pp. 191-195. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.09.014.

KRAMER, L., SIMÓN, F., TAMAROZZI, F., GENCHI, M. et BAZZOCCHI, C., 2005. Is Wolbachia complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Veterinary Parasitology*. octobre 2005. Vol. 133, n° 2-3, pp. 133-136. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.04.011.

KRYVORUCHENKO, D., 2022. Hematological parameters of dogs for parasitism *Dirofilaria immitis*. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 27 avril 2022. Vol. 5, n° 1, pp. 36-41. DOI 10.32718/ujvas5-1.06.

LAIDOUDI, Younes, DAVOUST, Bernard, VARLOUD, Marie, NIANG, El Hadji Amadou, FENOLLAR, Florence et MEDIANNIKOV, Oleg, 2020. Development of a multiplex qPCR-based approach for the diagnosis of *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *Acanthocheilonema reconditum*. *Parasites & Vectors*. décembre 2020. Vol. 13, n° 1, pp. 319. DOI 10.1186/s13071-020-04185-0.

LANDMANN, Frederic, VORONIN, Denis, SULLIVAN, William et TAYLOR, Mark J., 2011. Anti-filarial activity of antibiotic therapy is due to extensive apoptosis after Wolbachia depletion from filarial nematodes. *PLoS pathogens*. novembre 2011. Vol. 7, n° 11, pp. e1002351. DOI 10.1371/journal.ppat.1002351.

LANE, Jennifer N., LITSTER, Annette, LITTLE, Susan E., RODRIGUEZ, Jessica Y., MWACALIMBA, Kennedy K., SUNDSTROM, Kellee D., AMIRIAN, E. Susan, GUERIOS, Simone D., SERRANO, Maria A., HAYS, Kellie M. et LEVY, Julie K., 2021. Optimizing heartworm diagnosis in dogs using multiple test combinations. *Parasites & Vectors*. 26 avril 2021. Vol. 14, n° 1, pp. 224. DOI 10.1186/s13071-021-04715-4.

LATROFA, Maria Stefania, DANTAS-TORRES, Filipe, ANNOSCIA, Giada, GENCHI, Marco, TRAVERSA, Donato et OTRANTO, Domenico, 2012. A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and

Dirofilaria repens in dogs and mosquitoes. *Veterinary Parasitology*. avril 2012. Vol. 185, n° 2-4, pp. 181-185. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.10.038.

LATROFA, Maria Stefania, WEIGL, Stefania, DANTAS-TORRES, Filipe, ANNOSCIA, Giada, TRAVERSA, Donato, BRIANTI, Emanuele et OTRANTO, Domenico, 2012. A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta Tropica*. avril 2012. Vol. 122, n° 1, pp. 150-154. DOI 10.1016/j.actatropica.2012.01.006.

LEDESMA, Nicholas et HARRINGTON, Laura, 2011. Mosquito Vectors of Dog Heartworm in the United States: Vector Status and Factors Influencing Transmission Efficiency. *Topics in Companion Animal Medicine*. novembre 2011. Vol. 26, n° 4, pp. 178-185. DOI 10.1053/j.tcam.2011.09.005.

LEE, Seung-Gon, MOON, Hyeongsun Sunny et HYUN, Changbaig, 2008. Percutaneous heartworm removal from dogs with severe heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Journal of veterinary science*. 1 juillet 2008. Vol. 9, pp. 197-202. DOI 10.4142/jvs.2008.9.2.197.

LEMONS, Nathália Marques De Oliveira, ALBERIGI, Bruno, LABARTHE, Norma, KNACFUSS, Fabiana Batalha, BALDANI, Cristiane Divan et DA SILVA, Marta Fernanda Albuquerque, 2023. How does *Dirofilaria immitis* infection impact the health of dogs referred to cardiology care. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. 11 mai 2023. Vol. 44, pp. e002622. DOI 10.29374/2527-2179.bjvm002622.

LEPAGE, Daniel et BORDENSTEIN, Seth R., 2013. Wolbachia: Can we save lives with a great pandemic? *Trends in Parasitology*. août 2013. Vol. 29, n° 8, pp. 385-393. DOI 10.1016/j.pt.2013.06.003.

LOVIS, Léonore, GRANDJEAN, Mélanie, OVERNEY, Laurence, SEEWALD, Wolfgang et SAGER, Heinz, 2017. Seasonality and circadian variation of microfilaremia in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*. 30 août 2017. Vol. 243, pp. 235-241. DOI 10.1016/j.vetpar.2017.07.010.

MAGNIS, Johannes, LORENTZ, Susanne, GUARDONE, Lisa, GRIMM, Felix, MAGI, Marta, NAUCKE, Torsten J. et DEPLAZES, Peter, 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors*. 25 février 2013. Vol. 6, pp. 48. DOI 10.1186/1756-3305-6-48.

MCCALL, J.W., GENCHI, C., KRAMER, L., GUERRERO, J., DZIMIANSKI, M.T., SUPAKORNDEJ, P., MANSOUR, A.M., MCCALL, S.D., SUPAKORNDEJ, N., GRANDI, G. et CARSON, B., 2008. Heartworm and Wolbachia: Therapeutic implications. *Veterinary Parasitology*. décembre 2008. Vol. 158, n° 3, pp. 204-214. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.09.008.

MCHAFFIE, Jake, 2012. *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. *Parasitology Research*. février 2012. Vol. 110, n° 2, pp. 499-502. DOI 10.1007/s00436-011-2644-5.

MIRON, Liviu, 2016. *Guide des principales maladies parasitaires transmises des animaux non-humains aux humains - La dirofilariose chez les humains et les animaux*. 2016. Université des Sciences Agricoles et de Médecine Vétérinaire (USAMV), Iasi (Roumanie).

MONTOYA-ALONSO, José Alberto, CARRETÓN, Elena, SIMÓN, Luis, GONZÁLEZ-MIGUEL, Javier, GARCÍA-GUASCH, Laín, MORCHÓN GARCÍA, Rodrigo et SIMÓN, Fernando, 2015. *Prevalence of Dirofilaria immitis in dogs from Barcelona: Validation of a geospatial prediction model*. 27 juillet 2015.

MORCHÓN, Rodrigo, CARRETÓN, Elena, GONZÁLEZ MIGUEL, Javier et MELLADO HERNÁNDEZ, Isabel, 2012. Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe – New Distribution Trends. *Frontiers in Physiology* [en ligne]. 2012. Vol. 3. [Consulté le 14 mai 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2012.00196>

NEGRON, Veronica, SALEH, Meriam N., SOBOTYK, Caroline, LUKSOVSKY, Joe L., HARVEY, Tatiani V. et VEROCAI, Guilherme G., 2022. Probe-based qPCR as an alternative to modified Knott's test when screening dogs for heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in combination with antigen detection tests. *Parasites & Vectors*. 29 août 2022. Vol. 15, n° 1, pp. 306. DOI 10.1186/s13071-022-05372-x.

OTRANTO, Domenico, DANTAS-TORRES, Filipe, BRIANTI, Emanuele, TRAVERSA, Donato, PETRIĆ, Dusan, GENCHI, Claudio et CAPELLI, Gioia, 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*. décembre 2013. Vol. 6, n° 1, pp. 16. DOI 10.1186/1756-3305-6-16.

PANARESE, Rossella, IATTA, Roberta, MENDOZA-ROLDAN, Jairo Alfonso, SZLOSEK, Donald, BRAFF, Jennifer, LIU, Joe, BEUGNET, Frédéric, DANTAS-TORRES, Filipe, BEALL, Melissa J. et OTRANTO, Domenico, 2020. Comparison of Diagnostic Tools for the Detection of *Dirofilaria immitis* Infection in Dogs. *Pathogens*. 22 juin 2020. Vol. 9, n° 6, pp. 499. DOI 10.3390/pathogens9060499.

PĂSTRAV, Ioana Raluca, IONICĂ, Angela Monica, PEȘTEAN, Cosmin, NOVAKOVA, Eva, MODRÝ, David et MIHALCA, Andrei Daniel, 2018. Peripheral venous vs. capillary microfilariaemia in a dog co-infected with *Dirofilaria repens* and *D. immitis*: A comparative approach using triatomine bugs for blood collection. *Veterinary Parasitology*. 15 juin 2018. Vol. 257, pp. 54-57. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.05.017.

PHILP, Helen S., FARRELL, Kate S. et LI, Ronald H. L., 2023. Case report: Disseminated intravascular coagulation in a dog following treatment with melarsomine for *Dirofilaria immitis*. *Frontiers in Veterinary Science*. 6 février 2023. Vol. 10, pp. 1118798. DOI 10.3389/fvets.2023.1118798.

PRICHARD, Roger K., 2021. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: risks for prevention of heartworm disease. *International Journal for Parasitology*. décembre 2021. Vol. 51, n° 13-14, pp. 1121-1132. DOI 10.1016/j.ijpara.2021.08.006.

PULASKI, Cassan N, MALONE, John B, BOURGUINAT, Catherine, PRICHARD, Roger, GEARY, Timothy, WARD, Danielle, KLEI, Thomas R, GUIDRY, Tal, SMITH, George 'Bud', DELCAMBRE, Brooke, BOVA, Jonathan, PEPPING, Jenny, CARMICHAEL, James, SCHENKER, Rudolf et PARIAUT, Romain, 2014. Establishment of macrocyclic lactone resistant *Dirofilaria immitis* isolates in experimentally infected laboratory dogs. *Parasites & Vectors*. décembre 2014. Vol. 7, n° 1, pp. 494. DOI 10.1186/s13071-014-0494-6.

RANJBAR-BA, Shahrokh, ESLAMI, Ali et BOKAIC, Said, 2007. Evaluation of Different Methods for Diagnosis of *Dirofilaria immitis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 15 mai 2007. Vol. 10, n° 11, pp. 1938-1940. DOI 10.3923/pjbs.2007.1938.1940.

REINHOLD, Joanna, LAZZARI, Claudio et LAHONDÈRE, Chloé, 2018. Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. *Insects*. 6 novembre 2018. Vol. 9, n° 4, pp. 158. DOI 10.3390/insects9040158.

RHEE, Jae Ku, YANG, Sam Sung et KIM, Hyeon Cheol, 1998. Periodicity exhibited by *Dirofilaria immitis* microfilariae identified in dogs of Korea. *The Korean Journal of Parasitology*. décembre 1998. Vol. 36, n° 4, pp. 235-239. DOI 10.3347/kjp.1998.36.4.235.

RISHNIW, Mark, BARR, Stephen C., SIMPSON, Kenny W., FRONGILLO, Marguerite F., FRANZ, Marc et DOMINGUEZ ALPIZAR, Jose Luis, 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*. février 2006. Vol. 135, n° 3-4, pp. 303-314. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.10.013.

RIVOILAN, Pascal, 2020. La croissance démographique fléchit nettement en Nouvelle-Calédonie entre 2014 et 2019. *INSEE* [en ligne]. 2020. [Consulté le 11 juillet 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.insee.fr/fr/statistiques/4924021>

ROSSI, Maria Ines Doria, PAIVA, Jonimar, BENDAS, Alexandre, MENDES-DE-ALMEIDA, Flavya, KNACKFUSS, Fabiana, MIRANDA, Marcia, GUERRERO, Jorge, FERNANDES, Octavio et LABARTHE, Norma, 2010. Effects of doxycycline on the endosymbiont *Wolbachia* in *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)—Naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. novembre 2010. Vol. 174, n° 1-2, pp. 119-123. DOI 10.1016/j.vetpar.2010.07.019.

RUSH, John E., 2002. *Chronic Valvular Heart Disease in Dogs*. Tufts University. Waltham/OSU Symposium, Small Animal Cardiology, 2002.

SASSNAU, R., CZAJKA, C., KRONEFELD, M., WERNER, D., GENCHI, C., TANNICH, E. et KAMPEN, H., 2014. *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA findings in mosquitoes in Germany: temperature data allow autochthonous extrinsic development. *Parasitology Research*. août 2014. Vol. 113, n° 8, pp. 3057-3061. DOI 10.1007/s00436-014-3970-1.

SAVADELIS, Molly D., DAY, Katherine M., BRADNER, Jenna L., WOLSTENHOLME, Adrian J., DZIMIANSKI, Michael T. et MOORHEAD, Andrew R., 2018. Efficacy and side effects of doxycycline versus minocycline in the three-dose melarsomine canine adulticidal heartworm treatment protocol. *Parasites & Vectors*. décembre 2018. Vol. 11, n° 1, pp. 671. DOI 10.1186/s13071-018-3264-z.

SCHNYDER, Manuela et DEPLAZES, Peter, 2012. Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasites & vectors*. 2012. Vol. 5, n° 1, pp. 258-258. DOI 10.1186/1756-3305-5-258.

SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L. et JOHNE, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. novembre 2012. Vol. 113, n° 5, pp. 1014-1026. DOI 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.

SCHREY, C. F. et TRAUTVETTER, E., 1998. Canine and feline heartworm disease-diagnosis and therapy. . 1998. Vol. Waltham Focus, n° 8, pp. 23-30.

SEBOLT, Ana Paula Remor, SNAK, Alessandra, DE LIMA, Felipe Rieth, PILATI, Giulia Von Tönnemann, DE QUADROS, Rosileia Marinho, MILETTI, Luiz Cláudio, CHRYSSAFIDIS, Andreas Lazaros et DE MOURA, Anderson Barbosa, 2022. Prevalence and risk factors for *Dirofilaria immitis* in dogs from Laguna, Santa Catarina, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 1 avril 2022. Vol. 29, pp. 100697. DOI 10.1016/j.vprsr.2022.100697.

SELIM, Abdelfattah, ALANAZI, Abdullah D., SAZMAND, Alireza et OTRANTO, Domenico, 2021. Seroprevalence and associated risk factors for vector-borne pathogens in dogs from Egypt. *Parasites & Vectors*. 22 mars 2021. Vol. 14, n° 1, pp. 175. DOI 10.1186/s13071-021-04670-0.

SEMAT, Julie, 2016. *Mise en place d'une méthode de diagnostic moléculaire par PCR quantitative pour détecter et identifier les microfilaries sanguines de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* chez le chien*. Toulouse : Université Paul-Sabatier.

SERRANO-PARREÑO, B., CARRETÓN, E., CARO-VADILLO, A., FALCÓN-CORDÓN, S., FALCÓN-CORDÓN, Y. et MONTOYA-ALONSO, J. A., 2017. Pulmonary hypertension in dogs with heartworm before and after the adulticide protocol recommended by the American Heartworm Society. *Veterinary Parasitology*. 15 mars 2017. Vol. 236, pp. 34-37. DOI 10.1016/j.vetpar.2017.02.001.

SIMÓN, F., KRAMER, L. H., ROMÁN, A., BLASINI, W., MORCHÓN, R., MARCOS-ATXUTEGI, C., GRANDI, G. et GENCHI, C., 2007. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* Infection. *Veterinary Research Communications*. février 2007. Vol. 31, n° 2, pp. 161-171. DOI 10.1007/s11259-006-3387-0.

SIMÓN, Fernando, SILES-LUCAS, Mar, MORCHÓN, Rodrigo, GONZÁLEZ-MIGUEL, Javier, MELLADO, Isabel, CARRETÓN, Elena et MONTOYA-ALONSO, Jose Alberto, 2012. Human and Animal *Dirofilaria immitis*: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*. juillet 2012. Vol. 25, n° 3, pp. 507-544. DOI 10.1128/CMR.00012-12.

SOARES, Laynaslan A., MATIAS, Isabela C., SILVA, Samara S., RAMOS, Maria Estrela O., SILVA, Aline P., BARRETTO, Mariana L.M., BRASIL, Arthur W.L., SILVA, Maria Luana C.R., GALIZA, Glauco J.N. et MAIA, Lisanka A., 2022. Parasitological, serological and molecular diagnosis of *Dirofilaria immitis* in dogs in Northeastern Brazil. *Experimental Parasitology*. mai 2022. Vol. 236-237, pp. 108233. DOI 10.1016/j.exppara.2022.108233.

SOLGI, Rahmat, SADJJADI, Seyed Mahmoud, MOHEBALI, Mehdi, ZAREI, Zabihollah, GOLKAR, Majid et RAZ, Abbasali, 2018. Development of New Recombinant DgK Antigen for Diagnosis of *Dirofilaria immitis* Infections in Dogs Using ELISA Technique and Its Comparison to Molecular Methods. *Iranian Biomedical Journal*. juillet 2018. Vol. 22, n° 4, pp. 283-289. DOI 10.22034/ibj.22.4.283.

TEJEDOR-JUNCO, María Teresa, GONZÁLEZ-MARTÍN, Margarita, BERMEOGARRIDO, Estefanía, VILLASANA-LOAIZA, Rebeca et CARRETÓN-GÓMEZ, Elena, 2018. Doxycycline treatment for *Dirofilaria immitis* in dogs: impact on *Staphylococcus aureus*

and Enterococcus antimicrobial resistance. *Veterinary research communications*. 2018. Vol. 42, n° 3, pp. 227-232. DOI 10.1007/s11259-018-9727-z.

VELASQUEZ, Luisa, BLAGBURN, Byron L., DUNCAN-DECOQ, Rebecca, JOHNSON, Eileen M., ALLEN, Kelly E., MEINKOTH, James, GRUNTMEIR, Jeff et LITTLE, Susan E., 2014. Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Veterinary Parasitology*. 15 novembre 2014. Vol. 206, n° 1-2, pp. 67-70. DOI 10.1016/j.vetpar.2014.03.021.

VENCO, L., KRAMER, L. et GENCHI, Claudio, 2005. Heartworm disease in dogs: Unusual clinical cases. *Veterinary Parasitology*. octobre 2005. Vol. 133, n° 2-3, pp. 207-218. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.04.010.

VENCO, L., MCCALL, J. W., GUERRERO, J. et GENCHI, C., 2004. Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infections in dogs. *Veterinary Parasitology*. 5 octobre 2004. Vol. 124, n° 3, pp. 259-268. DOI 10.1016/j.vetpar.2004.06.024.

VENCO, Luigi, MANZOCCHI, Simone, GENCHI, Marco et KRAMER, Laura H., 2017. Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by *Dirofilaria repens* and *Angiostrongylus vasorum*. *Parasites & Vectors*. novembre 2017. Vol. 10, n° S2, pp. 476. DOI 10.1186/s13071-017-2444-6.

VIEIRA, Ana Luísa, VIEIRA, Maria João, OLIVEIRA, João Manuel, SIMÕES, Ana Rita, DIEZ-BAÑOS, Pablo et GESTAL, Juan, 2014. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. *Parasite*. 2014. Vol. 21, pp. 5. DOI 10.1051/parasite/2014003.

VILLENEUVE, Alain, 2014. *LA DIROFILARIOSE CANINE PROPOSITIONS DE TRAITEMENT ET DE PRÉVENTION APPROPRIÉES AU QUÉBEC*. 2014.

WATIER-GRILLOT, S., MARIÉ, J.-L., CABRE, O. et DAVOUST, B., 2011. Survey of Canine *Dirofilaria immitis* Infection in New Caledonia. *Veterinary Medicine International*. 11 avril 2011. Vol. 2011, pp. e380680. DOI 10.4061/2011/380680.

YILDIRIM, A., ICA, A., ATALAY, O., DUZLU, O. et INCI, A., 2007. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. *Research in Veterinary Science*. 1 juin 2007. Vol. 82, n° 3, pp. 358-363. DOI 10.1016/j.rvsc.2006.08.006.

YOON, won-Kyoung, HAN, Donghyun et HYUN, Changbaig, 2011. Catheter-guided percutaneous heartworm removal using a nitinol basket in dogs with caval syndrome. *Journal of veterinary science*. 1 juin 2011. Vol. 12, pp. 199-201. DOI 10.4142/jvs.2011.12.2.199.

YOON, Won-Kyoung, KIM, Ye-Won, SUH, Sang-I L, CHOI, Ran, LEE, Seung-Gon et HYUN, Changbaig, 2017. Evaluation of cardiopulmonary and inflammatory markers in dogs with heartworm infection during treatment with the 2014 American Heartworm Society recommended treatment protocol. *Parasites & Vectors*. novembre 2017. Vol. 10, n° S2, pp. 535. DOI 10.1186/s13071-017-2427-7.

ZAJAC, Anne et CONBOY, Gary, 2012. *Veterinary Clinical Parasitology, 8th Edition* [en ligne]. [Consulté le 24 mai 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.wiley.com/en-ca/Veterinary+Clinical+Parasitology%2C+8th+Edition-p-9780813820538>

ZHANG, Yingying, 2022. The understanding of heartworm disease: Diagnosis and treatments. In : . Melville : American Institute of Physics. 2022.

Annexes

Annexe 1 : Fiche d'information et feuille de consentement éclairé

Etude Dirofilariose canine – Nlle-Calédonie

Nr de cas	FICHE D'INFORMATION DU PROPRIETAIRE		Pays: <input type="text" value="Nlle-CALEDONIE"/>
FICHE D'INFORMATION DU PROPRIETAIRE			
Nom de l'animal:	<input type="text"/>		
Nom du propriétaire:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
	<i>Nom</i>	<i>Prénom</i>	
<p>Madame, Monsieur,</p> <p>La dirofilariose cardiopulmonaire, aussi appelée « maladie du ver du cœur » est une maladie d'évolution lente pouvant être à l'origine d'une insuffisance cardiaque invalidante et à la mort des animaux atteints en l'absence de traitement. Elle est due à un parasite (vers rond) appelé <i>Dirofilaria immitis</i> qui est transmis principalement au chien, et secondairement au chat, par la piqûre de moustiques. De nombreux canidés domestiques et sauvages peuvent être parasités, dont le chien et le chat. La transmission à l'Homme est possible, par la piqûre de moustique, mais le parasite ne se développera pas complètement chez ce dernier et n'attendra pas le stade adulte. Le chien est considéré comme un « réservoir » du parasite et à l'origine de l'infection des moustiques. Certains chiens peuvent déclarer des signes cliniques et être malades et ainsi présenter des signes d'insuffisance cardio-respiratoire (toux chronique, fatigabilité à l'effort, ...). A terme et sans traitement, cette maladie est mortelle.</p> <p>La répartition géographique de cette maladie dépend de celle des moustiques vecteurs et des mammifères réservoirs : elle est fréquente dans les DOM-TOM et sur le pourtour du bassin méditerranéen. La prévalence de cette infection est cependant méconnue chez le chien en Nouvelle-Calédonie.</p> <p>Conjointement à votre vétérinaire, nous vous invitons à faire participer votre chien à une enquête de prévalence. Cette étude est conduite par l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, dans le cadre d'une thèse vétérinaire afin d'évaluer la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire chez les chiens en Nouvelle-Calédonie. Les informations qui suivent vous aideront à comprendre les objectifs de l'étude. Veuillez les lire attentivement et demander à votre vétérinaire de vous expliquer tout ce que vous n'auriez pas parfaitement compris.</p> <p>➤ Informations relatives au déroulement de l'étude</p> <p>Cette étude vise à évaluer la prévalence de l'infection à <i>D. immitis</i> chez les chiens de Nouvelle-Calédonie</p> <ul style="list-style-type: none"> • par détection d'ADN (= matériel génétique) de <i>D. immitis</i> dans le sang des chiens inclus dans l'étude par la réalisation de PCR (Polymerase Chain Reaction) • par recherche d'antigènes parasitaires présents dans le sérum, par le biais d'un test sérologique rapide <p>Une prise de sang sera effectuée pour collecter des échantillons de sérum et de sang total. Tous les chiens doivent être âgés de plus d'un an et ne pas avoir reçu de traitement préventif contre la dirofilariose cardio-pulmonaire, c'est-à-dire :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dernier traitement contre les parasites externes à base de perméthrine réalisé il y a plus d'un mois (Advantix®, Vectra 3D®, Effitix®) - Absence de collier antiparasitaire de la marque Scalibor® ou collier mis en place il y a plus de 6 mois - Dernier traitement contre les parasites internes à base de lactones macrocycliques (Milbemax®, Milbactor®, Milprazon®, Milpro®, Stronghold®, Nexgard Spectra®, Credelio Plus®, Simparica Trio®) réalisés il y a plus d'un mois à l'exception du traitement à la moxidectine longue action (Guardian®) qui devra avoir été réalisé il y a plus de 6 mois. <p>-</p> <p>Votre chien bénéficiera d'un examen clinique approfondi avant tout prélèvement.</p> <p>➤ Confidentialité</p> <p>En dehors de votre vétérinaire, seules les personnes désignées par l'ENVT ou les représentants des autorités sanitaires, auront accès aux données recueillies concernant votre chien au cours de cette étude. Ces personnes sont liées par le secret professionnel.</p> <p>Si vous avez d'autres questions concernant cette étude, votre vétérinaire y répondra immédiatement.</p> <p>Nous vous remercions de participer à cette étude.</p>			

2

Contact : Dr. Emilie Bouhsira - Tél : 05 61 19 32 89 - emilie.bouhsira@envt.fr
Morgane Vergnaud – Tél : 07 83 92 33 61 – morgane.vergnaud_18@envt.fr

Nr de cas <input type="text"/>	CONSENTEMENT ECLAIRE DU PROPRIETAIRE	Pays: <input type="text"/> NLLE-CALEDONIE
--	---	---

<i>COPIE A CONSERVER PAR L'INVESTIGATEUR</i>		
Description de l'étude:	Enquête sur la prévalence de la dirofilariose cardio-pulmonaire chez les chiens en Nouvelle-Calédonie	
Vétérinaire:	<input type="text"/>	
Nom de l'animal:	<input type="text"/>	N° du cas <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Je, soussigné.e, certifie être le/la propriétaire (respectivement un représentant autorisé) de l'animal mentionné ci-dessus. 2. J'ai reçu, lu et compris la " Fiche d'Information du Propriétaire ". 3. Le vétérinaire a expliqué la nature de l'étude. Le vétérinaire a répondu à chacune de mes questions concernant l'étude 4. J'ai informé mon vétérinaire de tous les médicaments administrés à mon animal durant les 6 derniers mois, au mieux de mes connaissances. 5. J'autorise volontairement mon animal à participer à cette étude. 6. Je suis d'accord pour que le vétérinaire réalise un prélèvement de sang sur mon animal. 7. J'accepte de coopérer avec mon vétérinaire de façon à ce que l'étude soit menée conformément à toutes les instructions données. 8. J'accepte que des données personnelles soient intégrées et utilisées dans le cadre des études appropriées (incluant sans limite le transfert de données personnelles aux autorités vétérinaires à l'intérieur et à l'extérieur de l'Union Européenne en relation avec cette étude) 		
Nom du propriétaire:	<input type="text"/>	
	<i>Nom</i>	<i>Prénom</i>
Signature :	<input type="text"/>	Date : <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <i>J J M M A A</i>

Annexe 2 : Fiche de renseignements et examen clinique de l'animal

Etude Dirofilariose canine – Nlle-Calédonie

Nr de cas <input type="text"/>	FICHE CLINIQUE DE RENSEIGNEMENTS DE L'ANIMAL	Pays: Nlle-CALEDONIE
--	---	-----------------------------

INFORMATIONS CONCERNANT L'ANIMAL	
Nom (ou puce électronique)	<input type="text"/>
Adresse du propriétaire (adresse, ville, CP)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Âge	<input type="text"/> <input type="checkbox"/> Mois <input type="checkbox"/> Ans
Race	<input type="text"/>
Sexe	<input type="checkbox"/> Mâle Castré(e): <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Femelle <input type="checkbox"/> Non
Habitat / Milieu de vie	<input type="checkbox"/> Appartement <input type="checkbox"/> Dort à l'intérieur <input type="checkbox"/> Bord de mer <input type="checkbox"/> Maison <input type="checkbox"/> Dort à l'extérieur <input type="checkbox"/> Dans les terres

CRITERES D'INCLUSION	
Votre chien a plus d'un an	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
Votre animal a-t-il été traité avec un antiparasitaire externe ou un répulsif au cours du mois précédent ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
Votre animal a-t-il été traité avec de la moxidectine longue action (Guardian®) au cours des 6 derniers mois ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
Votre animal porte-t-il un collier antiparasitaire (type Scalibor®) ou son collier a été mis en place il y a plus de 6 mois ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
L'animal peut être inclus dans l'étude UNIQUEMENT si la réponse est «OUI» pour le première critère d'inclusion et « NON » pour l'ensemble des suivants	
Sur la base de cette section, l'animal est inclus dans l'étude	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui

Investigateur Signature/Initiale(s)	<input type="text"/>	Date	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
--	----------------------	------	--

5

Contact : Dr. Emilie Bouhsira - Tél : 05 61 19 32 89 - emilie.bouhsira@envt.fr
Morgane Vergnaud – Tél : 07 83 92 33 61 – morgane.vergnaud_18@envt.fr

Nr de cas <input type="text"/>	EXAMEN CLINIQUE VETERINAIRE	Pays: <u>NLLE-CALEDONIE</u>
-----------------------------------	------------------------------------	-----------------------------

ETAT GENERAL

Signes généraux	Fièvre <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Muqueuses pâles <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Intolérance à l'effort <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
	Perte de poids <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Dysorexie <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Ictère <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
	Asthénie <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Anorexie <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Oligurie/anurie <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
	Fatigabilité à l'effort <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
Signes cardiaques	Tachycardie <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Souffle <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Signes digestifs	Vomissement <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Diarrhée <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Signes respiratoires	Tachypnée <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Dyspnée <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Toux <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
Autres (ex., maladies chroniques, parasitoses,...)	<input type="checkbox"/>		

PRELEVEMENT:

- EDTA (PCR) 1 ml
- Tube sec 1 ml ou Snap-Test **Si snap-test : résultat**

Chaque prélèvement doit être identifié de telle sorte :

- **3 premières lettres** du nom de la clinique ou du cabinet ayant réalisé le prélèvement
- **Numéro du prélèvement** (le premier étant numéroté « 01 »)

Les prélèvements doivent être stockés au congélateur avant envoi.
Si un prélèvement sur tube sec est réalisé, le tube doit être centrifugé et le sérum collecté

Investigateur Signature/Initiale(s)		Date	J J / M M / A A
--	--	------	-----------------

Jour	Traitement
Jour 0	Chiens diagnostiqués et vérifiés positifs à la dirofilariose: <ul style="list-style-type: none"> • Test d'antigènes (Ag) positif vérifié avec un test des microfilaries (MF) • Si aucun microfilaire n'est détecté, confirmer avec un 2^e test Ag d'un autre fabricant Limiter les efforts. <ul style="list-style-type: none"> • Plus les symptômes sont importants, plus les efforts doivent être limités Si le chien est symptomatique: <ul style="list-style-type: none"> • Le stabiliser avec une thérapie et des soins appropriés • Prednisone administrée à 0,5 mg/kg deux fois par jour la 1^{re} semaine, 0,5 mg/kg une fois par jour la 2^e semaine, 0,5 mg/kg un jour sur deux la 3^e et 4^e semaine
Jour 1	Administrer un traitement préventif de la dirofilariose. <ul style="list-style-type: none"> • Si des microfilaries sont détectées, administrer des antihistaminiques et des glucocorticoides si la prednisone n'est pas déjà administrée, pour éviter les risques d'anaphylaxie • Garder en observation durant au moins 8 heures pour s'assurer de l'absence de réaction
Jour 1-28	Doxycycline administrée à 10 mg/kg deux fois par jour durant 4 semaines. <ul style="list-style-type: none"> • Réduit les complications liées à la mortalité des vers • Perturbe la transmission des dirofilaires
Jour 30	Administrer un traitement préventif de la dirofilariose.
Jour 60	Administrer un traitement préventif de la dirofilariose. Première injection de mélarosimine à 2,5 mg/kg par voie intramusculaire (IM) <ul style="list-style-type: none"> • Prednisone administrée à 0,5 mg/kg deux fois par jour la 1^{re} semaine, 0,5 mg/kg une fois par jour la 2^e semaine, 0,5 mg/kg un jour sur deux la 3^e et 4^e semaine Limiter encore plus les efforts physiques. <ul style="list-style-type: none"> • Confinement en cage/garder en laisse si jardin
Jour 90	Administrer un traitement préventif de la dirofilariose. Deuxième injection de mélarosimine à 2,5 mg/kg IM
Jour 91	Troisième injection de mélarosimine à 2,5 mg/kg IM <ul style="list-style-type: none"> • Prednisone administrée à 0,5 mg/kg deux fois par jour la 1^{re} semaine, 0,5 mg/kg une fois par jour la 2^e semaine, 0,5 mg/kg un jour sur deux la 3^e et 4^e semaine Continuer de limiter les efforts durant 6 à 8 semaines après la dernière injection de mélarosimine.
Jour 120	Test de détection des microfilaries. <ul style="list-style-type: none"> • Si positif, administrer des microfilaricides et procéder à un nouveau test 4 semaines plus tard. Mettre en place un traitement préventif de la dirofilariose sur toute l'année.
Jour 271	Test d'antigènes effectué 6 mois après la fin du traitement. Recherche de microfilaries.

Annexe 4 : Notice d'utilisation du snap-test Dirofilariose canine du laboratoire KITVIA (mars 2020)

DIROFILARIOSE CANINE

Notice d'utilisation

V2.1.2020/03

Principe du test
Le test rapide Dirofilariosis Canine Ag est un test immunochromatographique pour la détection qualitative de l'antigène de *Dirofilaria immitis* dans le sérum, le plasma ou le sang total.

Le test se compose d'une zone de contrôle (C) et d'une zone de test (T). Ces lignes ne sont visibles que lorsque l'échantillon a été déposé. La ligne de contrôle sert de témoin, et doit toujours apparaître si le test s'est déroulé correctement et si les réactifs ont fonctionné. La ligne de test apparaît si suffisamment d'antigène est présent dans l'échantillon. Les anticorps choisis spécialement pour ce test sont utilisés à la fois comme matériel de capture et de détection. Cela permet au test d'identifier l'antigène de *Dirofilaria immitis* dans le sérum, le plasma ou le sang total avec un haut degré de précision.

Contenu du kit

- 1) 1 ou 10 tests
- 2) 1 ou 10 pipettes jetables
- 3) 1 ou 10 tubes de prélèvement EDTA
- 4) 1 notice d'utilisation

Précautions

- 1) Pour les diagnostics vétérinaires uniquement.
- 2) Le test est sensible à l'humidité et à la chaleur. Utiliser le test immédiatement après l'avoir sorti de son emballage.
- 3) Ne pas réutiliser les composants du kit.
- 4) Appliquer le diluant de manière verticale.
- 5) Ne pas toucher la membrane du puits échantillon.
- 6) Ne pas utiliser le test au-delà de la date d'expiration.
- 7) Ne pas utiliser le test si l'emballage est endommagé.
- 8) Ne pas mélanger les composants de kits ayant un numéro de lot différent.
- 9) Manipuler les échantillons avec précaution, porter des gants.

Conservation et stabilité

- Le kit peut être stocké à température ambiante ou à température réfrigérée (2 à 30 °C). Il est stable jusqu'à la date indiquée sur l'emballage.
- NE PAS CONGELER.
- Conserver le kit à l'abri de la lumière et de la chaleur.

Préparation de l'échantillon

- 1) Sang total, sérum ou plasma

[Sang total] Prélever du sang total et l'introduire dans un flacon contenant de l'anticoagulant (EDTA, héparine ou citrate de sodium). Si l'échantillon n'est pas utilisé tout de suite, le conserver au réfrigérateur (2-8°) et l'utiliser dans les 24h.

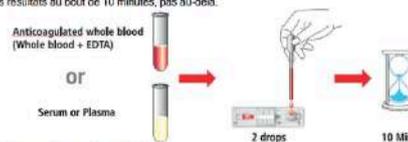
[Sérum] Prélever du sang total et l'introduire dans un flacon sans anticoagulant (ni EDTA, ni héparine, ni citrate de sodium), le laisser reposer 30 minutes et le centrifuger pour obtenir un sang surnageant.

[Plasma] Prélever du sang total et l'introduire dans un flacon contenant de l'anticoagulant (EDTA, héparine ou citrate de sodium) puis le centrifuger pour obtenir du plasma.

- 2) Si les échantillons de sérum/plasma ne sont pas testés immédiatement, les conserver au réfrigérateur (2-8°) jusqu'à 72h. Pour les stocker plus longtemps, il est conseillé de les congeler.
- 3) Les échantillons doivent impérativement être ramené à température ambiante avant leur utilisation.
- 4) Les échantillons de sérum/plasma contenant un précipité sont susceptibles de donner des résultats incorrects. Il est donc conseillé de les centrifuger afin d'éliminer ces précipités.
- 5) Les échantillons de sérum/plasma hémolysés ou contaminés sont susceptibles de donner des résultats incorrects.

Procédure de test

- 1) Sortir le test de son emballage et le poser sur une surface plane et sèche.
- 2) Prélever de l'échantillon à l'aide de la pipette fournie.
- 3) Déposer 2 gouttes (environ 80µl) de sérum, plasma ou sang total dans le puits du test.
- 4) Après quelques secondes, une ligne de couleur mauve traverse la fenêtre de résultat.
- 5) Si aucune migration n'apparaît après une minute, ajuster une goutte d'échantillon.
- 6) Interpréter les résultats au bout de 10 minutes, pas au-delà.



Interprétation des résultats

- 1) Une bande de couleur apparaît dans la partie gauche de la fenêtre de résultat pour indiquer que le test fonctionne correctement. Cette bande est la ligne de contrôle (C).
- 2) La partie droite de la fenêtre de résultat indique les résultats du test. Si une autre bande de couleur apparaît dans la partie droite de la fenêtre de résultat, cette bande est la ligne de test (T).

1) Résultat négatif
La présence d'une seule ligne colorée en face du repère «C» indique un résultat négatif.



2) Résultat positif
Les deux lignes C et T colorées signifient un résultat positif pour le vecteur recherché.



3) Résultat invalide
Si aucune ligne colorée n'apparaît en face du repère «C», le résultat est considéré comme non valide. La procédure n'a pas été suivie correctement ou le test a été détérioré. Il convient de tester à nouveau l'échantillon.



Limites

Bien que le test soit très précis en matière de détection qualitative de l'antigène de *Dirofilaria immitis*, une faible probabilité de résultats erronés est possible. D'autres tests cliniques sont nécessaires si des résultats discutables sont obtenus. Comme dans tous tests, un diagnostic clinique définitif ne devrait pas être basé sur les résultats d'un seul et unique test, mais devrait être fait après évaluation de tous les indices cliniques.



15 Chemin Parbois
31800 LABARTHE-INARD, France

+33(0)5 88 88 854
support@kitvia.fr

www.kitvia.com

Annexe 5 : Manuel d'utilisation du NucleoSpin® Tissue pour l'extraction d'ADN génomique et viral à partir d'échantillons sanguins

NucleoSpin® Tissue

6.5 Support protocol for genomic DNA and viral DNA from blood samples

Before starting the preparation:

- Check if Buffer B5 and Proteinase K were prepared according to section 3.
- Before elution, preheat Elution Buffer BE to 70 °C.

1-2 Prepare sample / Pre-lyse sample

Not necessary

3 Lyse blood sample

Pipette 25 µL Proteinase K and up to 200 µL blood, buffy coat, or body fluid sample (equilibrated to room temperature) into 1.5 mL microcentrifuge tubes (not provided).

For sample volumes less than 200 µL, add PBS to adjust the volume to 200 µL. If purifying DNA viruses, we recommend starting with 200 µL serum or plasma. If cultured cells are used, resuspend up to 5 x 10⁷ cells in a final volume of 200 µL PBS.

Add 200 µL Buffer B3 to the samples and vortex the mixture vigorously (10–20 s).

Incubate samples at room temperature for 5 min. Mix.

Incubate samples at 70 °C for 10–15 min.

The lysate should become brownish during incubation with Buffer B3. Increase incubation time with Proteinase K (up to 30 min) and vortex once or twice vigorously during incubation if processing older or clotted blood samples.

4 Adjust DNA binding conditions

Add 210 µL ethanol (96–100%) to each sample and vortex again.

5 Bind DNA

For each preparation, take one NucleoSpin® Tissue Column placed in a Collection Tube and load the sample. Centrifuge 1 min at 11,000 x g. If the samples are not drawn through the matrix completely, repeat the centrifugation at higher g-force (< 15,000 x g). Discard Collection Tube with flow-through.

Proceed with step 6 (Wash silica membrane) of the standard protocol (see section 5).

MACHEREY-NAGEL – 03/2014, Rev. 13 21

NucleoSpin® Tissue

6 Wash silica membrane

1st wash

Add 500 µL Buffer BW. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the Collection Tube.

2nd wash

Add 600 µL Buffer B5 to the column and centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the Collection Tube.

6 Dry silica membrane

Centrifuge the column for 1 min at 11,000 x g. Residual ethanol is removed during this step.

7 Elute highly pure DNA

Place the NucleoSpin® Tissue Column into a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided) and add 100 µL prewarmed Buffer BE (70 °C). Incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge 1 min at 11,000 x g.

For alternative elution procedures see section 2.3.

+ 500 µL BW

11,000 x g, 1 min

+ 600 µL B5

11,000 x g, 1 min

11,000 x g, 1 min

+ 100 µL BE (70 °C)

RT, 1 min

11,000 x g, 1 min







MACHEREY-NAGEL – 03/2014, Rev. 13 16

Annexe 6 : Questionnaire à l'attention des vétérinaires calédoniens concernant leurs habitudes vis-à-vis du diagnostic, de la prévention et du traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire (via Google Form)

2. De quels produits injectables disposez-vous dans votre pharmacie pour la prévention de la dirofilariose ? *

Plusieurs réponses possibles.

- Guardian
- ProHeart 6
- ProHeart 12
- Iovmec
- Autre : _____

3. Quel mode de prévention préconisez vous le plus souvent ? *

Plusieurs réponses possibles.

- Administration mensuelle par voie orale
- Administration régulière mais non mensuelle par voie orale
- Administration mensuelle d'ivermectine
- Administration régulière mais non mensuelle d'ivermectine
- Administration biannuelle de Guardian ® ou Proheart 6 ®
- Administration annuelle de ProHeart 12 ®
- Administration annuelle de Guardian ® ou Proheart 6 ®

4. Concernant le diagnostic de la dirofilariose cardio-pulmonaire, en routine dans votre structure, vous réalisez systématiquement *

Une seule réponse possible.

- Un test rapide seul (ex : Kitvia, 4DX, ...)
- Une observation directe d'une goutte de sang au microscope seule
- À la fois un test rapide et une observation directe
- Cela dépend du cas, vous réalisez parfois les deux tests, parfois l'un ou l'autre

5. Si vous réalisez parfois l'un ou l'autre, pourquoi ? _____

Habitudes concernant le diagnostic, le traitement et la prévention de la dirofilariose cardiopulmonaire en Nouvelle-Calédonie

Bonjour, je m'appelle Morgane et suis actuellement en dernière année à l'École Vétérinaire de Toulouse. Je réalise ma thèse sur la prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire en Nouvelle-Calédonie. La dirofilariose cardiopulmonaire est une pathologie affectant le chien, liée à la présence de filaires de D. immitis dans les artères pulmonaires et, plus rarement, le cœur droit. Sa prévalence a été estimée à 57% en 1993. Sa gestion, depuis son diagnostic jusqu'au traitement, revêt une place importante au sein de la médecine vétérinaire calédonienne. Les praticiens y sont ainsi confrontés quasi-quotidiennement. Ce questionnaire a ainsi pour objectif de répertorier les pratiques des vétérinaires néo-calédoniens concernant le diagnostic, le traitement et la prévention de la dirofilariose cardiopulmonaire.

* Indique une question obligatoire

1. De quels produits administrables par voie orale et en spot-on disposez-vous dans votre pharmacie pour la prévention de la dirofilariose ? *

Plusieurs réponses possibles.

- HeartGard ®
- Milbemax ®
- Milbactor ®
- Milpro ®
- Nexgard Spectra ®
- Stronghold ®
- Selames ®
- Evicto ®
- Interceptor ®
- Advocate ®
- Simparica Trio ®
- Autre : _____

6. Dans votre pharmacie, pour le traitement de la dirofilariose, vous disposez de : *

Plusieurs réponses possibles.

- Diroban® (Zoetis)
 Immiticide® (Boehringer Ingelheim)
 Aucun des deux
 Autre : _____

7. Concernant le traitement de la dirofilariose cardio-pulmonaire, vous utilisez *

Une seule réponse possible.

- Systématiquement une spécialité aducliticide (Diroban®, Immiticide®)
 Jamais de spécialité aducliticide
 Parfois une spécialité aducliticide, selon le cas

8. Si vous n'utilisez pas systématiquement de molécule aducliticide, quelles raisons conditionnent votre choix ? _____

9. Lorsque vous utilisez des molécules aducliticides, vous mettez en place un protocole en _____

Une seule réponse possible.

- 2 injections à 24h d'intervalle
 1 injection puis 1 mois plus tard, 2 injections à 24h d'intervalle
 Autre : _____

10. Lorsque vous n'utilisez pas de spécialité aducliticide (Diroban®, Immiticide®), quelle molécule utilisez-vous ?

Une seule réponse possible.

- Ivermectine par voie parentérale
 Autres lactones macrocycliques administrables par voie orale

11. En cas de traitement dit "slow kill", à quel intervalle renouvelez-vous le test ?

Une seule réponse possible.

- 1 an
 2 ans
 Jamais
 Autre : _____

12. En cas de traitement dit "slow kill", si vous réalisez une antibiothérapie à base de doxycycline, la renouvelez-vous tous les ans jusqu'à ce que le chien se négative ?

Une seule réponse possible.

- Oui
 Non

13. Concernant les traitements dits « adjuvants », vous ajoutez à votre plan thérapeutique *

Une seule réponse possible par ligne.

	Jamais	Parfois	Souvent	Systématiquement
Doxycycline	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Corticoides	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aspirine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

23/08/2023 09:45

Tâche(s) concernant le diagnostic, le traitement et la prévention de la diverticulose coloproctale en Nouvelle-Calédonie

14. Si la sévérité du cas nécessite une stabilisation au niveau cardio-respiratoire, * vous intégrez à votre arsenal thérapeutique

Une seule réponse possible par ligne.

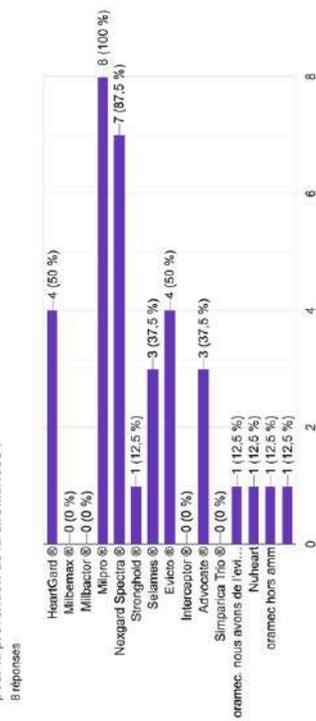
	Jamais	Parfois	Souvent	Systematiquement
Inotrope positif (Ex : pimobendane)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
IECA (Ex : bénezépril)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Anti-hypertenseur pulmonaire (Ex : silidénafil)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Diurétiques	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ce contenu n'est ni rédigé, ni cautionné par Google.

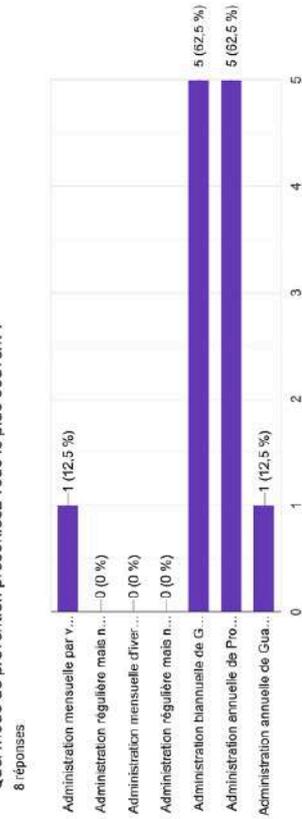
Google Forms

Annexe 7 : Résultats du questionnaire à l'attention des vétérinaires calédoniens concernant leurs habitudes vis-à-vis du diagnostic, de la prévention et du traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire (via Google Form)

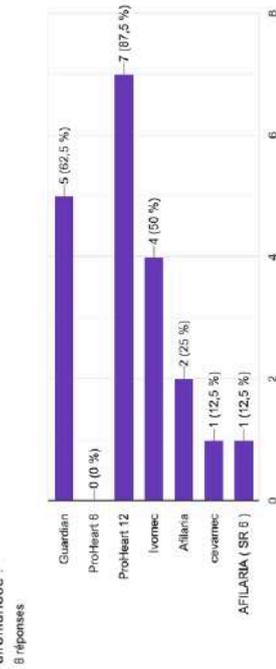
De quels produits administrables par voie orale et en spot-on disposez-vous dans votre pharmacie pour la prévention de la dirofilariose ?



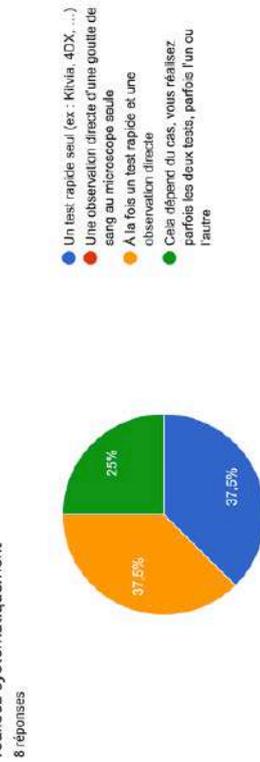
Quel mode de prévention préconisez vous le plus souvent ?



De quels produits injectables disposez-vous dans votre pharmacie pour la prévention de la dirofilariose ?



Concernant le diagnostic de la dirofilariose cardiopulmonaire, en routine dans votre structure, vous réalisez systématiquement



Si vous réalisez parfois l'un ou l'autre, pourquoi ?

3 réponses

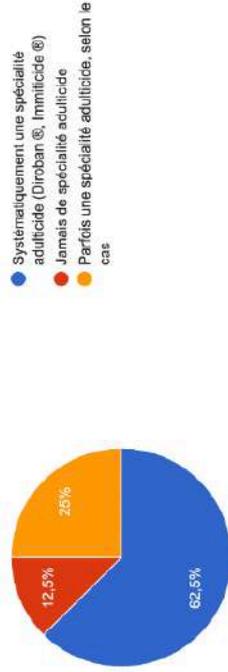
test rapide seul : souvent c'est un chien qui évoque cliniquement la dirofilariose, si la lame est positive nous ne faisons pas le kitvia par souci d'économies. Nous sommes amenés parfois à faire un kitvia seul quand il y a eu un trou de prévention (ex un retard de 4-5 mois sur l'injection de proheart, et nous faisons un test kitvia 1 an après le trou pour voir s'il y a eu une contamination sur la période.

Selon les moyens des personnes. Certaines personnes ne veulent pas payer de test rapide. Nous devons donc nous contenter de l'observation. Nous prevenons donc les gens qu'il n'est absolument pas fiable.

Test rapide = plus fiable et spécifique

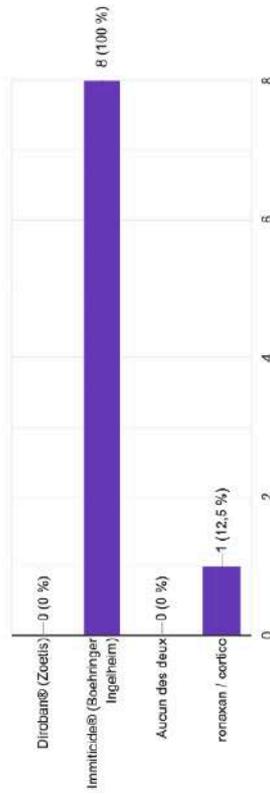
Concernant le traitement de la dirofilariose cardio-pulmonaire, vous utilisez

8 réponses



Dans votre pharmacie, pour le traitement de la dirofilariose, vous disposez de :

8 réponses



Si vous n'utilisez pas systématiquement de molécule adulticide, quelles raisons conditionnent votre

choix ?

4 réponses

nous le recommandons systématiquement mais les freins sont surtout économiques pour le proprio et le fait de devoir garder le chien à l'attache 2 mois.

L'état général de l'animal

Pas d'adulticide sur un animal âgé et fortement infesté

trop de risque

Lorsque vous utilisez des molécules adulticides, vous mettez en place un protocole en 8 réponses



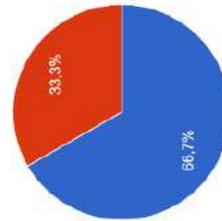
- 2 injections à 24h d'intervalle
- 1 injection puis 1 mois plus tard, 2 injections à 24h d'intervalle
- l'un ou l'autre en fait cela dépend si l'animal est symptomatique ou non
- Cela dépend de la gravité des cas
- réponse 1 sur chien asymptomatique...
- les 2 selon le risque
- en fonction de l'infestation selon proto...
- selon l'âge du chien et symptômes car...

En cas de traitement dit "slow kill", à quel intervalle renouvelez-vous le test ? 7 réponses



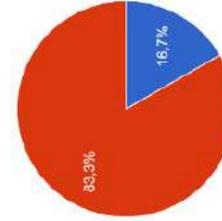
- 1 an
- 2 ans
- Jamais
- au bout de 8 mois si les gens le souhaitent
- pas de traitement slow kill
- dépend des cas
- à un an si demande du propriétaire

Lorsque vous n'utilisez pas de spécialité adulticide (Diroban®, Immiticide®), quelle molécule utilisez-vous ? 3 réponses



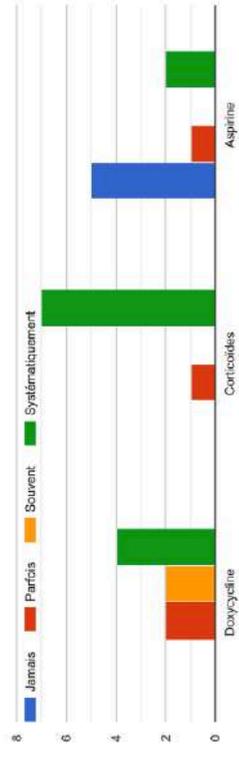
- Ivermectine par voie parentérale
- Autres lactones macrocycliques administrables par voie orale

En cas de traitement dit "slow kill", si vous réalisez une antibiothérapie à base de doxycycline, la renouvelez-vous tous les ans jusqu'à ce que le chien se négative ? 6 réponses

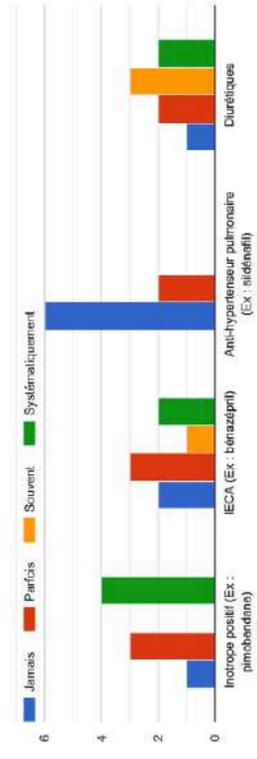


- Oui
- Non

Concernant les traitements dits « adjuvants », vous ajoutez à votre plan thérapeutique



Si la sévérité du cas nécessite une stabilisation au niveau cardio-respiratoire, vous intégrez à votre arsenal thérapeutique



Anamnèse et commémoratifs											Résultats	
Numéro de dossier	Nom propriétaire	Nom animal	Sexe	Statut sexuel	Type	Race	Âge	Médicalisation	Lieu de couchage	Signes cliniques	PCR	Snap-Test
001-01	TAUKOLO	Nova	Mâle	Stérilisé	Croisé (Labrador/Rottweiler)	Grande	1 à 2 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Non réalisé
001-02	CHARLON	Ora	Femelle	Stérilisé	Cane Corso	Grande	3 à 4 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-03	LUCON	Mia	Femelle	Entier	Bouvier Australien	Grande	6 à 7 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-04	HAEWENG	Tchala	Femelle	Entier	Croisé (Sharpei/Rottweiler)	Grande	1 à 2 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-05	LELARGUE	Mvia	Femelle	Entier	Croisé Berger	Grande	3 à 4 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-06	CHOCZYNSKI	Eliott	Mâle	Stérilisé	Bichon frisé	Petite	> 8 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-07	PUECH	Scarlette	Femelle	Stérilisé	Chihuahua	Petite	1 à 2 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-08	BLONDE	Bibi	Femelle	Stérilisé	Bichon frisé	Petite	2 à 3 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
002-01	GOYETCHE	Mickey	Mâle	Stérilisé	Lévrier	Grande	6 à 7 ans	Non	Extérieur	Oui	Négatif	Positif
002-02	VERGNAUD	Rodin	Mâle	Stérilisé	Berger Australien	Grande	2 à 3 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-09	CLAVEL	Rouquin	Mâle	Stérilisé	Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui	Négatif	Négatif
001-10	MEDINA	Opale	Femelle	Stérilisé	Dalmatien	Grande	3 à 4 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-11	MEDINA	Hinata	Femelle	Stérilisé	Croisé Pitbull	Grande	3 à 4 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-12	LAVILLE	Lola	Femelle	Stérilisé	Labrador	Grande	> 8 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-13	SCHMIDT	Dana	Femelle	Stérilisé	Pitbull	Grande	> 8 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Non réalisé
001-14	TUUGHALA	Chloé	Femelle	Stérilisé	Chihuahua	Petite	3 à 4 ans	Non	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
002-03	PARAGE	Kyra	Femelle	Stérilisé	Pitbull	Grande	1 à 2 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
002-04	JAQUET	Piwy	Mâle	Entier	Chihuahua	Petite	3 à 4 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
003-01	RANC	Gino	Mâle	Stérilisé	Croisé	Grande	3 à 4 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
003-02	LBAN	Ouêmo	Mâle	Stérilisé	Croisé Labrador	Grande	5 à 6 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-15	BAYE	Koda	Mâle	Entier	Labrador	Grande	4 à 5 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-16	MOROHI	Mauji	Mâle	Entier	Croisé Rottweiler	Grande	3 à 4 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-17	GERVOLINO	Cooke	Femelle	Entier	Bully	Grande	3 à 4 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-18	WEDE	Tapioca	Mâle	Stérilisé	Croisé bouvier	Grande	5 à 6 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-19	TARDIVEL	Sherkan	Mâle	Entier	Croisé Berger	Grande	> 8 ans	Oui	Extérieur	Oui	Négatif	Négatif
001-20	PETITJEAN	Chioie	Femelle	Stérilisé	Bichon frisé	Petite	6 à 7 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-21	BONDEAU	Kirash	Mâle	Entier	Croisé Pitbull	Grande	3 à 4 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-22	COURTOT	Rice	Femelle	Stérilisé	Croisé Dalmatien	Grande	2 à 3 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-23	HUGOT	Laurane	Femelle	Stérilisé	Bichon frisé	Petite	1 à 2 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-24	RURJHAU	Castor	Mâle	Stérilisé	Croisé Berger	Grande	5 à 6 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-25	ROGER	Reva	Femelle	Stérilisé	Croisé Pitbull	Grande	2 à 3 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-26	PANDOSY	Joy	Femelle	Entier	Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Non	Positif	Positif
001-27	LOO	Never	Mâle	Stérilisé	Croisé Spitz	Petite	5 à 6 ans	Non	Intérieur	Non	Négatif	Positif
001-28	TEISSIER	Rocky	Mâle	Stérilisé	Croisé Labrador - Fox	Petite	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui	Négatif	Négatif
001-29	HELLOUIN	Naia	Femelle	Stérilisé	Boxer	Grande	5 à 6 ans	Oui	Extérieur	Oui	Négatif	Négatif
001-30	FOND	Tcheky	Femelle	Stérilisé	Croisé Berger	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-31	BOURDET	Rusty	Mâle	Entier	Bouvier Australien	Grande	2 à 3 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-32	PETITJEAN	Wolf	Mâle	Entier	Amstaff	Grande	4 à 5 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-33	MONFORTE	Bob	Mâle	Entier	Croisé Berger	Grande	2 à 3 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-34	CHARLON	Queen	Femelle	Stérilisé	Cane Corso	Grande	5 à 6 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-35	CHARLON	Val	Mâle	Entier	Cane Corso	Grande	6 à 7 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif

001-36	CHARLON	Orc	Mâle	Entier	Cane Corso	Grande	4 à 5 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-37	TAHAR	Mirza	Mâle	Entier	Chihuahua	Petite	4 à 5 ans	Non	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-38	WAMEID	Puanaua	Mâle	Entier	Croisé Berger	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui	Négatif	Positif
001-39	SCHMIDT	Tom-Li	Mâle	Entier	Chihuahua	Petite	> 8 ans	Non	Intérieur	Oui	Négatif	Négatif
001-40	MAZENS	Fillie	Femelle	Stérilisé	Bouvier Australien	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-41	LEFEBVRE	Jean-Louis	Mâle	Entier	Croisé Berger	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-42	VANAI	Jade	Femelle	Stérilisé	Croisé Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-43	TANGUY	Ladea	Femelle	Stérilisé	Croisé Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui	Négatif	Positif
001-44	FRICOTTE	Edgi	Mâle	Entier	Bichon Frisé	Petite	> 8 ans	Non	Intérieur	Oui	Négatif	Positif
001-45	TUTONU	Begreen	Femelle	Entier	Croisé Berger	Grande	6 à 7 ans	Non	Extérieur	Non	Positif	Positif
001-46	HERVOUJET	Harley	Femelle	Stérilisé	Croisé Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Non	Positif	Positif
001-47	SURELLE	Kimbo	Mâle	Stérilisé	Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-48	MEZIERES	César	Mâle	Entier	Croisé Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui	Négatif	Négatif
001-49	MOREAU	Kaora	Femelle	Stérilisé	Croisé Boxer	Grande	2 à 3 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-50	BRUYERE	Miss	Femelle	Stérilisé	Croisé Dalmatien	Grande	2 à 3 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-51	TAXIER	Mila	Femelle	Stérilisé	Croisé Berger	Grande	6 à 7 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-52	TAXIER	Bogian	Mâle	Entier	Pitbull	Grande	4 à 5 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-53	GRAVINA	Ramses	Mâle	Entier	Croisé Berger	Grande	2 à 3 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-54	VALIN	Igloo	Femelle	Entier	Croisé Bichon	Petite	> 8 ans	Non	Intérieur	Non	Positif	Positif
001-55	LEGRAND	Hadès	Mâle	Entier	Pitbull	Grande	1 à 2 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-56	FIGA	Rocky	Mâle	Stérilisé	Pitbull	Grande	3 à 4 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-57	HARBULOT	Fillie	Femelle	Stérilisé	Croisé Berger	Grande	3 à 4 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-58	MADEC	Fidji	Femelle	Stérilisé	Croisé Boxer	Grande	7 à 8 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Positif
001-59	LUCONE	Pilou	Femelle	Entier	Croisé Griffon	Grande	7 à 8 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-60	REGNIER	Roquette	Femelle	Entier	Croisé Bichon	Petite	7 à 8 ans	Non	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-61	MIMART	Dana	Femelle	Stérilisé	Croisé Pitbull	Grande	1 à 2 ans	Oui	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-62	SAVOIE	Citron	Femelle	Stérilisé	Croisé Berger	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui	Négatif	Négatif
001-63	LECREN	Odin	Mâle	Entier	Croisé Labrador	Grande	6 à 7 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-64	HUGOT	Louky	Femelle	Stérilisé	Croisé Pitbull	Grande	7 à 8 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-65	CHIRON	Naya	Femelle	Stérilisé	Berger Allemand	Grande	5 à 6 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
001-66	HELLOUIN	Comète	Femelle	Entier	Croisé Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui	Positif	Positif
001-67	SAINT-MARC	Pêche	Femelle	Entier	Chihuahua	Petite	7 à 8 ans	Oui	Intérieur	Non	Négatif	Négatif
001-68	WAMYTAN	Pépito	Mâle	Entier	Croisé Berger	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui (forme atypique)	Négatif	Positif
001-69	SURELLE	Rambo	Mâle	Stérilisé	Pitbull	Grande	> 8 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Négatif
001-70	NANTY	Boby	Mâle	Entier	Croisé Berger	Petite	> 8 ans	Non	Extérieur	Oui	Négatif	Positif
003-03	LBAN	Ouméo 2	Mâle	Entier	Croisé Berger	Grande	2 à 3 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
003-04	LBAN	Era	Femelle	Entier	Croisé Pitbull	Grande	3 à 4 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif
003-05	LBAN	"Tub 01"	Mâle	Entier	Croisé Berger	Grande	2 à 3 ans	Non	Extérieur	Non	Négatif	Positif

Nom et prénom : VERGNAUD Morgane

Titre : Prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire chez le Chien en Nouvelle-Calédonie

La dirofilariose cardiopulmonaire du chien est une pathologie causée par la filaire de *Dirofilaria immitis*, transmise via la piqûre d'un moustique vecteur. La présence d'adultes et de stades larvaires de *D. immitis* dans le système cardiovasculaire de l'hôte peut être à l'origine d'une hypertension pulmonaire et d'une insuffisance cardiaque, menant généralement à la mort de l'animal à plus ou moins long terme. La maladie atteint des prévalences importantes dans les zones tropicales, ces régions offrant des conditions climatiques propices au développement du parasite et de son vecteur.

En Nouvelle-Calédonie, territoire insulaire localisé au milieu de l'Océan Pacifique, la prévalence de la maladie a été estimée à 57% en 1993. Depuis, les méthodes de diagnostic mais également les recommandations en termes de prévention et de traitement de la pathologie ont évoluées significativement.

Des chiens amenés en consultation dans différentes structures vétérinaires du territoire ont été prélevés (n = 79) afin d'être testés en sérologie (test antigénique) et par biologie moléculaire (qPCR). La prévalence de la dirofilariose cardiopulmonaire rapportée dans ce travail est de 39%.

Mots-clés : Dirofilariose cardiopulmonaire, *Dirofilaria immitis*, Chien, Nouvelle-Calédonie, Epidémiologie, Prévalence

Title : Prevalence of cardiopulmonary dirofilariasis in dogs in New-Caledonia

Heartworm disease in dogs is caused by the filarial nematode *Dirofilaria immitis*, transmitted through the bite of an infected mosquito vector. The presence of adults and larval stages of *D. immitis* in the host's cardiovascular system can induce pulmonary hypertension and heart failure, leading most of the time to the animal's death. The disease reaches high prevalences in tropical areas, where climatic conditions are suitable for the parasite and vector life-cycle.

In New-Caledonia, an island located in the middle of the Pacific Ocean, the disease's prevalence was estimated at 57% in 1993. Since then, the methods of diagnosis but also the recommendations in terms of prevention and treatment of the disease have significantly evolved.

Dogs (n = 79) coming to several veterinary practices of the territory were included in this work and blood sampled for further serological (antigen test) and molecular biology (qPCR) analysis. The overall prevalence of heartworm disease reported in this study was 39%.

Key words : Heartworm disease, *Dirofilaria immitis*, Dogs, New-Caledonia, Epidemiolog, Prevalence