



HAL
open science

Mise au point d'une méthode permettant d'évaluer la réponse vaccinale a médiation cellulaire chez le chien

Thomas Quinard

► **To cite this version:**

Thomas Quinard. Mise au point d'une méthode permettant d'évaluer la réponse vaccinale a médiation cellulaire chez le chien. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04771788

HAL Id: dumas-04771788

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04771788v1>

Submitted on 7 Nov 2024

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

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

ANNEE 2024 THESE : 2024 – TOU 3 – 4072

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE PERMETTANT D'ÉVALUER LA RÉPONSE VACCINALE A MÉDIATION CELLULAIRE CHEZ LE CHIEN

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

QUINARD Thomas, Louis

Directeur de thèse : M. Maxime FUSADE-BOYER

JURY

PRESIDENT :

M. Romain VOLMER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Maxime FUSADE-BOYER
Madame Séverine BOULLIER

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

MEMBRE INVITE :

M. Pierre BESSIERE

Assistant d'enseignement et de recherche en infectiologie à l'Ecole
Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ANNEE 2024 THESE : 2024 – TOU 3 – 4072

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE PERMETTANT D'ÉVALUER LA RÉPONSE VACCINALE A MÉDIATION CELLULAIRE CHEZ LE CHIEN

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

QUINARD Thomas, Louis

Né le 06/09/1999 à CLERMONT-FERRAND (63)

Directeur de thèse : M. Maxime FUSADE-BOYER

JURY

PRESIDENT :

M. Romain VOLMER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Maxime FUSADE-BOYER
Madame Séverine BOULLIER

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

MEMBRE INVITE :

M. Pierre BESSIERE

Assistant d'enseignement et de recherche en infectiologie à l'Ecole
Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

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 **PRYMENKO 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**, *Microbiologie et infectiologie*
- 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 règlementées*
- 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*

Table des matières

Introduction	9
A. Étude bibliographique	11
I. La parvovirose canine.....	11
1. Le parvovirus canin : présentation.....	11
a. Classification.....	11
b. Importance épidémiologique et médicale	11
c. Résistance.....	12
d. Morphologie et génome	12
II. Cycle viral.....	13
1. Pathogénicité.....	14
2. Réponse immunitaire face au parvovirus canin.....	15
3. La vaccination contre le parvovirus canin	16
a. Les enjeux de la vaccination	16
b. Les vaccins à agents vivants atténués : seuls types de vaccins disponibles sur le marché français	17
c. Importance des variants de CPV utilisés	18
d. Les spécialités autorisées sur le marché français.....	19
e. Directives de vaccination canine contre le parvovirus canin	20
III. La réponse immunitaire antivirale à médiation cellulaire.....	21
1. Les interférons de type I : signal synonyme d'infection virale	22
a. Effet autocrine	22
b. Effet paracrine	22
2. L'interaction entre les pathogen recognition receptors (PRR) et les pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) : un autre signal d'infection virale.....	23
3. Rôle des lymphocytes T CD4 dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire	23
4. Rôle des LTc dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire	24
5. Mise en mémoire des lymphocytes	25
IV. Méthodes d'étude de la réponse immunitaire à médiation cellulaire	25
1. Stimulation de sang total ou stimulation des PBMC	25
2. Protocoles de stimulation du sang total	28
3. Protocoles d'isolement et de stimulation des PBMC.....	28
4. Différentes méthodes de quantification et d'évaluation de la qualité de la réponse immunitaire.....	29
a. Cytométrie en flux	29
b. ELISA	29
c. RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction).....	29

d.	Tests à base de billes.....	30
5.	Quels marqueurs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire étudier ?.....	30
a.	Les gènes induits par l'IFN- γ : des biomarqueurs de choix	30
b.	Les fonctions de CXCL10.....	32
B.	Étude expérimentale.....	32
I.	Matériel et méthode.....	32
1.	Donneurs et prélèvements des échantillons	32
2.	Stimulation du sang total	33
a.	Expérience 1 : utilisation de concentrations en peptides de CPV faibles à modérées	33
b.	Expérience 2 : utilisation de fortes concentrations en peptides de CPV	34
3.	Isolation des PBMC et stimulation.....	35
a.	Isolation des PBMC.....	35
b.	Expérience 3 : stimulation des PBMC	36
c.	Expérience 4 : utilisation de jeunes individus en cours de primo-vaccination.....	37
4.	Extraction d'ARN.....	37
5.	RTq-PCR	37
II.	Résultats	38
1.	Expérience 1.....	38
2.	Expérience 2.....	39
3.	Expérience 3.....	40
4.	Expérience 4.....	40
III.	Discussion	41
1.	Les peptides viraux ne semblent pas permettre la stimulation du sang total lors des trois premiers protocoles	41
2.	Un dernier protocole aux résultats ininterprétables	43
3.	La stimulation de sang totale est indépendante de la concentration en peptides utilisée	43
4.	La stimulation des PBMC : une méthode aux résultats variables	44
5.	Des expériences préliminaires avec un nombre d'échantillons limité.....	45
6.	La stimulation de sang total par des peptides viraux : une méthode simple et rapide pouvant se démocratiser	45
7.	Des stratégies innovantes permettent de s'affranchir de l'interférence des AOM lors de la vaccination.....	46
	Conclusion.....	46
	Bibliographie.....	48

Table des figures

Figure 1 : Génome d'un parvovirus canin : ADN et ARN (acide ribonucléique).	13
Figure 2 : Comment les anticorps d'origine maternelle (MDA) interfèrent avec l'immunisation par la vaccination précoce des chiots.	17
Figure 3 : Schéma simplifié de l'apoptose d'une cellule induite par le système perforine-granzyme d'un LTc.....	24
Figure 4 : Microscopie en fluorescence temporelle d'un lymphocyte T cytotoxique et d'une cellule cible de souris en présence de 100 μ M de iodure de propidium (rouge) et 2,5 μ M de colorant nucléaire vert SYTO 24	25
Figure 5 : A. Dénombrement normalisé des gènes candidats sélectionnés pour la validation en aval en fonction de l'expression différentielle par rapport au DMSO. B. Corrélation entre le gène candidat et l'expression de l' IFN- γ (dénombrement normalisé des gènes).	31
Figure 6 : Schéma du protocole expérimental 1	34
Figure 7 : Schéma du protocole expérimental 2	35
Figure 8 : Schéma du protocole d'isolation des PBMC	36
Figure 9 : Schéma du protocole expérimental 3	36
Figure 10 : Expression du gène CXCL10. A. RT-qPCR réalisées sur des échantillons dilués au dixième. B. RT-qPCR réalisées sur des échantillons non dilués.	39
Figure 11 : Expression du gène CXCL10.	39
Figure 12 : Expression du gène CXCL10.	40
Figure 13 : Expression du gène CXCL10.	41
Figure 14 : Expression du gène CXCL10.	41

Table des tableaux

Tableau 1 : Spécialités vaccinales disposants d'une AMM en France.....	20
Tableau 2 : Comparaison entre la stimulation de sang total et la stimulation de PBMC.	27
Tableau 3 : Protocoles de vaccination des individus ayant participé à l'étude.....	33
Tableau 4 : Amorces utilisées pour les RT-qPCR	38

Liste des abréviations

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells (Cellules mononuclées du sang périphérique)

SARS-CoV-2 : severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (syndrome respiratoire aigüe sévère coronavirus 2)

PCR : polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay (dosage immuno-enzymatique)

CPV : canine parvovirus (parvovirus canin)

VP : viral protein (protéine virale)

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNpm : acide ribonucléique pré-messager

NS : non-structural (protéine non structurale)

TfR : transferrin receptor (récepteur à la transferrine)

Fab : fragment antigen binding (fragment de liaison à l'antigène des immunoglobulines)

IgG : immunoglobuline G

AOM : anticorps d'origine maternelle

DICC₅₀ : dose infectante pour 50 % des cultures cellulaires

ANMV : agence nationale du médicament vétérinaire

AMM : autorisation de mise sur le marché

CDV : comité de directives de la vaccination

WSAVA : world small animal veterinary association

IFN-I : interférons de type I

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

PRR : pathogen recognition receptors

PAMPs : pathogen-associated molecular patterns

TLR : toll-like receptors

LT CD4 : lymphocyte T CD4

CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

IL12 : interleukine 12

LTh1 : lymphocyte T helper 1

IFN- γ : interféron gamma

LT CD8 : lymphocyte T CD8

CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

LTc : lymphocytes T cytotoxique

CXCL9 : CXC motif chemokine ligand 9

CXCL10 : CXC motif chemokine ligand 10

TCR : récepteur des lymphocytes T

IL7 : interleukine 7

IL15 : interleukine 15

NK : natural killer (cellule tueuse naturelle)

RPMI : roswell park memorial institute

IMDM : iscove's modified dulbecco's medium

PBS : phosphate buffered saline (solution tamponnée au phosphate).

DMSO : diméthylsulfoxyde.

ELISpot : enzyme-linked immuno spot

ANKRD22 : ankyrin repeat domain 22

GBP1 : guanylate binding protein 1

IL2 : interleukine 2

COVID-19 : coronavirus disease 2019

IP-10 : interferon gamma-induced protein 10 (protéine 10 induite par l'interféron gamma)

CXCR3 : CXC motif chemokine receptor 3

BSA : bovine serum albumin (albumine de sérum bovin).

CO2 : dioxyde de carbone

RT-qPCR : reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne quantitative avec transcription inverse)

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

SVF : sérum de veau fœtal

ARNm : acide ribonucléique messenger

Introduction

Les vaccins exploitent la capacité de notre système immunitaire à se souvenir des antigènes qu'il a rencontrés. Pierre angulaire des programmes de prévention, ils ont permis le contrôle de plusieurs maladies, en santé animale comme en santé humaine. C'est par exemple en grande partie grâce à eux que la France doit son statut indemne de rage (Müller, Freuling 2018). La protection vaccinale repose sur deux types de réponses, la réponse à médiation humorale, faisant intervenir lymphocytes B et anticorps, et celle à médiation cellulaire, impliquant les lymphocytes T. En dehors de leur contribution au développement des lymphocytes B dans les nœuds lymphatiques, le rôle des lymphocytes T est encore mal caractérisé : il est cependant

clair qu'ils sont indispensables au bon contrôle d'une infection. Les études chez des individus immunodéprimés ont montré que l'absence d'anticorps augmentait le risque d'être infecté par un agent pathogène, tandis que l'absence de lymphocytes T résultait en une incapacité à en maîtriser la multiplication (Pollard, Bijker 2021). À titre d'exemple, chez l'homme, une déficience en lymphocytes T rend l'infection par le virus de la varicelle fatale, alors qu'un individu avec une déficience en anticorps guérit de la même façon qu'un individu immunocompétent.

En pratique, c'est souvent la mesure du taux d'anticorps qui est utilisée pour évaluer le niveau de protection suite à la vaccination. Mesurer ce taux est relativement facile, d'autant plus que des plateformes automatisées existent. Quantifier la réponse cellulaire est, au contraire, techniquement plus difficile : il faut isoler les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), les mettre en culture, puis les stimuler avec des antigènes. Là où une méthode prend quelques heures tout au plus, l'autre prend plusieurs jours. Pourtant, cette réponse cellulaire est particulièrement intéressante à étudier. En effet, le taux d'anticorps n'est par exemple pas corrélé à une protection efficace pour des maladies comme la leishmaniose (Solano-Gallego et al. 2009) ou la calicivirose féline (Poulet et al. 2008). De même, un taux élevé d'anticorps n'est pas nécessairement corrélé à une réponse cellulaire importante : réponses humorales et cellulaires peuvent être indépendantes, en termes de magnitude ou de persistance dans le temps (Schwarz et al. 2022).

Isoler et stimuler les PBMC n'est pas forcément nécessaire pour quantifier la réponse cellulaire. En effet il est possible de stimuler directement du sang total. Développée dans différents contextes depuis de nombreuses années, cette méthode a connu un nouvel essor avec la recherche autour des vaccins contre le SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). En stimulant quelques heures du sang de patients vaccinés avec un mélange d'antigènes de la protéine S du virus, plusieurs équipes de recherche sont parvenues à quantifier différents effecteurs de la réponse cellulaire, à la fois par PCR (Polymerase Chain Reaction) et par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Schwarz et al. 2022; Borobia et al. 2021). En plus d'être rapide, cette méthode est particulièrement peu onéreuse : l'incubation a lieu dans un simple incubateur, directement dans le tube de prélèvement.

Stimuler du sang total chez les carnivores domestiques avec des peptides correspondant aux principaux agents pathogènes contre lesquels des vaccins existent permettrait de quantifier la réponse vaccinale, presque au chevet du patient. À notre connaissance, ceci n'a jamais été

réalisé jusqu'à présent, à l'exception de rares études sur la leishmaniose, où des versions légèrement plus complexes de cette méthode sont utilisées (Martínez-Orellana et al. 2017).

Nous souhaitons montrer que la stimulation du sang total par des mélanges de peptides issus d'un agent pathogène est un moyen simple, efficace et précis, permettant d'évaluer la réponse immunitaire à médiation cellulaire dans un contexte vaccinal, au travers de l'exemple de la parvovirose canine. Ce choix repose sur différents critères : il s'agit d'une maladie grave et endémique, faisant partie des principales causes de mortalité du chiot, malgré l'existence d'un vaccin utilisé en routine (Decaro, Buonavoglia, Barrs 2020).

Nous nous attendons à trouver différents gènes ou différentes protéines, spécifiques de l'activation des lymphocytes T, qui nous permettront de quantifier (par PCR ou par ELISA) la réponse immunitaire à médiation cellulaire des animaux vaccinés.

A. Étude bibliographique

I. La parvovirose canine

1. Le parvovirus canin : présentation

a. Classification

Le genre *Parvovirus* contient de nombreux virus qui ont tous la particularité de se développer dans les cellules en multiplication des mammifères ou des oiseaux. De part cette propriété, ce sont les entérocytes qui en sont la cible préférentielle, voire les cardiomyocytes chez de très jeunes individus. Parmi les différents virus du genre, nous nous intéresserons aux parvovirus canins et plus particulièrement aux parvovirus canins de type 2a (CPV-2a), 2b (CPV-2b) et 2c (CPV-2c) qui sont les agents pathogènes responsables de la parvovirose canine, une maladie endémique dans la plupart des pays, dont la France (Parrish et al. 1991; Doki et al. 2006; Calderon et al. 2009; Meers et al. 2007; Buonavoglia et al. 2001).

b. Importance épidémiologique et médicale

La parvovirose canine est une maladie très contagieuse qui se caractérise principalement par une entérite hémorragique. Elle affecte les chiens non vaccinés, insuffisamment vaccinés ou mal vaccinés. Le taux de mortalité lié à cette maladie varie de plus de 90 % chez des individus

non traités à environ 14 % chez des animaux pris en charge médicalement (Horecka et al. 2020; Sarpong, Lukowski, Knapp 2017). Ce taux de mortalité est d'autant plus important que l'animal est jeune. De plus, 3,3 % des cas répertoriés de parvovirose canine le sont chez des individus vaccinés dans les 12 derniers mois et parmi ces cas 89,5 % étaient des animaux de moins d'un an (Ling et al. 2012).

c. Résistance

Les parvovirus étant des virus nus, ils sont extrêmement résistants dans l'environnement : ils peuvent survivre jusqu'à un an à température ambiante dans un milieu organique. Leur résistance est également avérée dans des conditions de froid positif ou négatif, en milieu acide ou basique ($3 \leq \text{pH} \leq 9$). En revanche, même s'ils supportent relativement bien la déshydratation, cette dernière nuit à leur pouvoir pathogène. De plus, ils sont détruits par les rayons ultraviolets, la javel diluée au 30^{ème}, le formol dilué au 100^{ème} ou un traitement d'une minute à 100 °C (Polycopié de Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 2006/2007).

d. Morphologie et génome

Un virion de parvovirus canin a une structure icosaédrique d'environ 25 nm de diamètre et un poids moléculaire allant de 5,5. 10³ à 6,2. 10³ kD. Sa capsid est composée d'un assemblage de trois protéines structurales différentes : VP1 (Viral Protein 1), VP2 et VP3, présentes en 60 exemplaires. VP2 représente 90 % de la capsid et possède 10 sites antigéniques qui font protrusion à la surface du virion. Les dépressions de la protéine permettent, quant à elles, la fixation de la particule virale à la cellule cible (Tsao et al. 1991).

Le génome des parvovirus canins est composé d'une molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) monocaténaire d'environ 5200 nucléotides de longueur. Il contient deux promoteurs qui permettent la synthèse de deux ARN_{pm} (acide ribonucléique pré-messager) qui, après épissage alternatif, permettront la synthèse des protéines structurales VP1 et VP2 et de deux protéines non structurales : NS1 et NS2 (Parrish 1999). VP3 est obtenue par clivage de 15 à 20 acides aminés de l'extrémité N-terminale de VP2 (Tsao et al. 1991) (Figure 1).

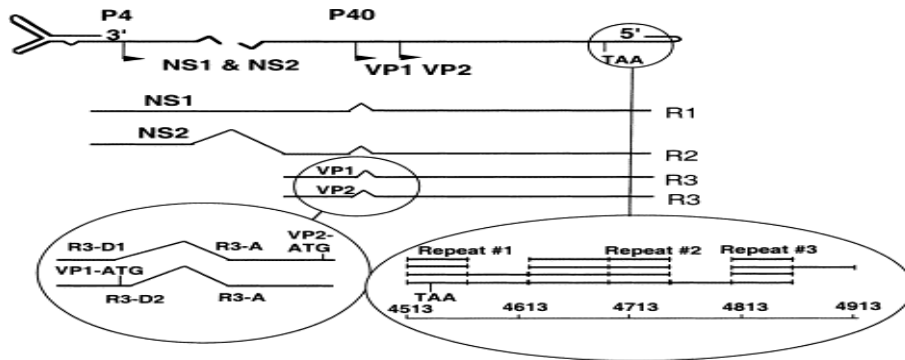


Figure 1 : Génome d'un parvovirus canin : ADN et ARN (acide ribonucléique). D'après Parrish 1999.

Les parvovirus utilisant les ADN polymérases de leurs hôtes, ils devraient avoir le même taux de substitution de nucléotides qu'eux. En réalité, si cela semble vrai pour les virus à ADN bicaténaire, ce n'est pas le cas des virus à ADN simple brin. Ainsi, les parvovirus ont un taux de substitution de nucléotides élevé, qui se rapproche davantage des taux connus pour les virus à ARN (Shackelton et al. 2005; Drake 1991; Parrish et al. 1991). Cela explique donc la grande diversité des variants existants et l'évolution des souches de CPV depuis l'identification du CPV-2 en 1978 (Parrish et al. 1988).

II. Cycle viral

Le cycle viral du parvovirus peut être découpé en cinq étapes : l'attachement, la pénétration, la phase d'éclipse, la production de nouveaux virions et l'excrétion.

L'attachement, qui se produit entre le virion et la cellule à infecter, se fait, entre autres, par liaison entre une partie en dépression de la protéine structurale VP2 et le récepteur à la transferrine (TfR) (Hueffer et al. 2003).

La pénétration intervient ensuite par endocytose. Elle nécessite une température de 38 à 39 °C pour être optimale et un pH acide à l'intérieur de l'endosome pour que le virion puisse s'en échapper. Il faut également la présence des protéines qui interviennent classiquement lors d'endocytose notamment les clathrines et les microtubules. Par la suite, le virion est guidé vers le noyau cellulaire grâce à son interaction avec les microtubules. Le mécanisme par lequel le virus pénètre à l'intérieur du noyau et son désenveloppement est, quant à lui, mal connu. Même si l'extrémité N-terminale de VP1 forme un signal de localisation nucléaire et que théoriquement la petite taille de la capside permettrait son passage à travers les pores nucléaires,

en réalité, il a été démontré que ce mécanisme n'existe pas. En effet, le blocage expérimental des pores nucléaires n'empêche pas l'infection (Harbison, Chiorini, Parrish 2008).

La phase d'éclipse commence par le passage d'une molécule d'ADN monocaténaire à une molécule bicaténaire grâce au détournement d'une ADN polymérase de la cellule hôte. Cette étape ne peut avoir lieu que lors de la phase S de la mitose. S'en suivent les phases de transcription puis de traduction grâce au détournement de la machinerie cellulaire de la cellule infectée.

La synthèse de nombreuses protéines structurales ainsi que le clivage de l'ADN double brin en ADN simple brin permettent par assemblage de former de nouveaux virions.

A son profit, le virus inhibe la réplication de l'ADN de la cellule hôte, sa transcription et la traduction des ARN (Ihalainen et al. 2009). Cela va donc entraîner la dégénérescence de la cellule, permettant ainsi l'excrétion des nouveaux virions.

1. Pathogénicité

L'âge au moment de l'infection est un facteur majeur de la gravité de la parvovirose. Ce virus a un tropisme pour les cellules en division, il se multiplie ainsi principalement dans le myocarde, l'épithélium intestinal, la moelle osseuse et les organes lymphatiques.

La réplication virale commence dans l'oropharynx au cours des deux premiers jours de l'infection. La virémie apparaît 3 à 5 jours après le début de l'infection. Des signes cliniques tels qu'une hyperthermie et une lymphopénie se manifestent alors, marquant le début de la maladie. L'évolution de l'infection dépend fortement de l'âge du chien. En effet, chez des chiots nouveau-nés les cardiomyocytes se divisent beaucoup plus activement que les entérocytes, ainsi ce sont des cibles privilégiées pour le parvovirus. Cependant les myocardites restent rares car, à ce stade de vie, la plupart des chiots sont protégés par les anticorps d'origine maternelle transmis par le colostrum. Chez les chiots plus âgés, ce sont les intestins qui deviennent la cible principale du virus.

La virémie va permettre au virus d'atteindre les cellules des cryptes intestinales, qui permettent la régénération de l'épithélium intestinal. Le pic d'infection de ces cellules est atteint 5 à 6 jours post contamination. Les portions intestinales touchées sont l'iléon et le jéjunum ainsi que le duodénum dans une moindre mesure. L'estomac et le côlon sont épargnés.

L'excrétion du virus commence dès le 3^{ème} jour post infection, avant l'apparition des signes cliniques, qui débutent aux jours 5 et 6 (parfois au jour 4). Au niveau intestinal, le parvovirus provoque la destruction des cellules germinatives des cryptes intestinales. Cela entraîne la nécrose de l'épithélium, l'abrasion des villosités intestinales, des vomissements ainsi que de la diarrhée à cause d'une absorption insuffisante. Parallèlement, l'infection des organes lymphoïdes entraîne la nécrose et la lyse des cellules des lignées lymphoïdes. On observe alors une lymphopénie et dans les cas les plus graves, une pancytopenie.

La réponse immunitaire se met en place en moins d'une semaine et on peut déjà détecter des anticorps circulants au début de la phase clinique. L'infection se propageant par voie sanguine, la présence d'anticorps sériques est essentielle à la protection de l'animal contre le parvovirus. La rapidité d'apparition de la réponse immunitaire est cruciale pour surmonter la maladie : une réponse immunitaire rapidement mise en place entraînera une atteinte bénigne. Une fois la phase aiguë de la maladie passée, la guérison est généralement rapide et complète, conférant une protection à vie contre une réinfection (Thiry 2015).

2. Réponse immunitaire face au parvovirus canin

Comme évoqué précédemment, la réponse immunitaire à médiation humorale joue un rôle crucial dans la protection face au parvovirus canin. Une partie de cette réponse, et notamment les mécanismes de fixation des anticorps à la capsid du virus, a été étudiée par une étude publiée en 2007 (Nelson et al. 2007). La capsid virale possède deux sites de fixation aux anticorps : les sites A et B, sans distinction d'affinité. La fixation des anticorps sur les virions peut bloquer différentes étapes du cycle viral, en provoquant l'agrégation des virions, en empêchant leur liaison aux membranes cellulaires ou aux TfR en modifiant leur conformation. Plusieurs autres mécanismes de défense de l'organisme, comme la phagocytose, l'opsonisation et la mort cellulaire programmée, contribuent également à combattre l'infection.

Le virus peut être neutralisé par les "Fab" (fragment antigen binding) des immunoglobulines G (IgG). Ces derniers sont composés de la chaîne légère et d'une partie de la chaîne lourde des anticorps. Certains Fab ont une forte capacité de neutralisation, tandis que d'autres n'ont que peu, voire pas d'effet. Ces différentes capacités de neutralisation dépendent de plusieurs facteurs. Par exemple la fixation au site B de VP2 est plus efficace que la fixation au site A. De plus, même si tous les Fab testés réduisent l'affinité du virion pour les TfR, certains sont capables de bloquer totalement la phase d'attachement du virus, tandis que d'autres ne bloquent

pas entièrement cette phase même à forte concentration. Ainsi, même s'il existe 25 sites de liaisons entre les Fab et la capsid, les Fab les plus neutralisants n'ont besoin de se fixer qu'au nombre de 6 sur la capsid pour bloquer 80 % des liaisons avec les TfR. Malgré cela, comme les TfR subissent très facilement des endocytoses, les cellules seront facilement infectées par le parvovirus même si la capsid n'est que faiblement liée au TfR (Palermo, Hafenstein, Parrish 2006).

Ainsi, le faible nombre de sites de fixation permettant une forte neutralisation et le grand nombre d'anticorps nécessaires expliquent pourquoi le parvovirus peut infecter les cellules de l'hôte même en présence d'anticorps. Cela est d'autant plus vrai dans le cas d'individus dont l'immunité est affaiblie. Ces études sont essentielles pour le développement de vaccins toujours plus efficaces.

La réponse immunitaire à médiation cellulaire intervient également lors d'une infection au parvovirus canin mais n'est pas du tout étudiée dans ce contexte. Son fonctionnement lors d'infections virales sera traité ultérieurement.

3. La vaccination contre le parvovirus canin

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

a. Les enjeux de la vaccination

Chez les chiens la transmission de l'immunité de la mère aux chiots se fait essentiellement grâce au colostrum. En effet le placenta endothéliochorial des chiennes ne permet le passage que de 5 à 10 % des IgG de la mère (Decaro, Buonavoglia, Barrs 2020). Le reste des anticorps est transmis via l'ingurgitation du colostrum durant les premières heures de vie des chiots. Ces anticorps d'origine maternelle (AOM) offrent une protection cruciale au jeune chiot et sont essentiels pendant ses premières semaines de vie. Cependant, ils peuvent limiter l'efficacité des vaccins. En effet, chez un chiot de quelques semaines, lors d'utilisation d'un vaccin à agent vivant atténué, les AOM peuvent neutraliser le virus ou la souche vaccinale sans que l'immunité adaptative du chiot puisse se mettre en place. Ainsi, après disparition des AOM, le chiot sera encore naïf vis à vis du parvovirus. Un titre en AOM de 1:20 suffit à interférer avec la vaccination. Le taux d'AOM décroît de manière exponentielle, avec un temps de demi-vie de

9,7 jours chez le chiot (Pollock, Carmichael 1982b). Cependant, le titre initial en AOM chez les chiots varie d'un individu à l'autre en fonction, notamment, du titre en anticorps de la mère et de la quantité de colostrum ingurgitée. Ainsi, les AOM peuvent être présents en quantité suffisante pour neutraliser le vaccin jusqu'à 15 semaines après la naissance chez certains chiots. Cependant, le titre de 1:20 neutralisant pour un vaccin est bien inférieur au titre minimum de 1:80 conférant une immunité contre le parvovirus (Pollock, Carmichael 1982b). De cela résulte une période de 2 à 3 semaines durant laquelle le chiot n'est pas protégé contre la maladie, mais reste réfractaire à la vaccination, appelée fenêtre de sensibilité (Decaro, Buonavoglia, Barrs 2020) (Figure 2). Le défi de la vaccination est donc de réduire au minimum la durée de cette fenêtre de sensibilité.

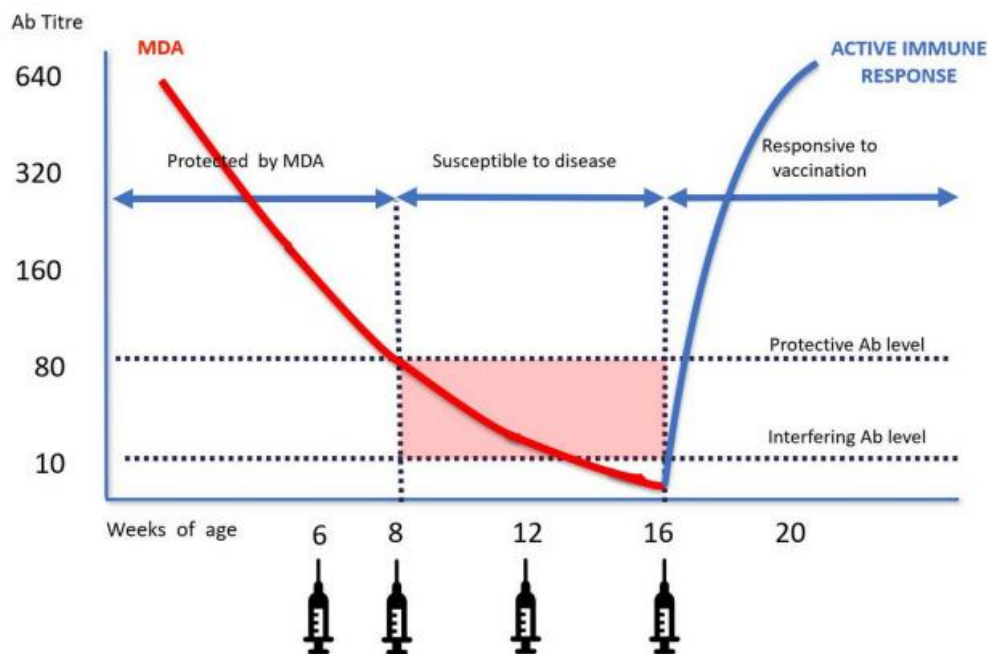


Figure 2 : Comment les anticorps d'origine maternelle (MDA) interfèrent avec l'immunisation par la vaccination précoce des chiots. D'après Squires et al. 2024.

b. Les vaccins à agents vivants atténués : seuls types de vaccins disponibles sur le marché français

Un vaccin à agent vivant atténué correspond à un virus capable d'infecter des cellules et de se répliquer, tout en ayant perdu son pouvoir pathogène. A l'inverse, un vaccin à agent inactivé contient un virus inactivé par traitement physique ou chimique, incapable d'infecter une cellule et de se répliquer.

Les vaccins à agents vivants induisent une réponse de type humorale et cellulaire en mimant une infection. Cette double réponse permet la mise en place d'une mémoire immunitaire durable. De plus, la protection vaccinale est établie dès 7 à 14 jours post vaccination, ce qui permet de réduire la fenêtre de sensibilité par rapport aux vaccins inactivés. Malgré tout, cette fenêtre est encore assez large, puisqu'elle dure 2 à 3 semaines.

Pour diminuer encore cette période à risque, de nouvelles générations de vaccins ont été mises au point : les vaccins à agents vivants atténués à haut titre. Dans ces derniers, non seulement l'atténuation des souches virales est plus légère, mais surtout le titre en antigènes viraux est fortement augmenté. Prenons l'exemple, d'une étude menée sur 61 chiots de 5 à 11 semaines qui a comparé l'efficacité de la vaccination avec la souche CPV-2 NL-35-D à différentes concentrations : $10^{5,4}$ DICC₅₀ (dose infectante pour 50 % des cultures cellulaires), $10^{5,7}$ DICC₅₀, $10^{7,0}$ DICC₅₀ et $10^{7,6}$ DICC₅₀ (Burtonboy et al. 1991). Les vaccins utilisés conventionnellement à l'époque avaient un titre en antigène viral inférieur à $10^{7,0}$ DICC₅₀. Il a alors été démontré que les vaccins les plus concentrés donnaient lieu à une meilleure réponse vaccinale et ce même en présence d'un taux d'AOM plus important (Buonavoglia et al. 1992). Dans les faits, la mise au point de cette nouvelle génération de vaccin a permis de réduire la fenêtre de sensibilité à une dizaine de jours.

Les vaccins vivants atténués présentent des risques minimes. En effet, il est théoriquement possible que la souche vivante atténuée retrouve sa virulence après inoculation, mais pour le moment, un tel cas n'a jamais été mis en évidence dans le cadre de la vaccination contre le parvovirus. Le virus vaccinal peut également être excrété dans les selles 4 à 7 jours après la vaccination en quantité théoriquement suffisante pour être infectieuse. Cependant une contamination par ce biais a été exclue (Doki et al. 2006).

c. Importance des variants de CPV utilisés

Actuellement, la majorité des vaccins disponibles sur le marché français utilise le variant CPV-2, pourtant quasiment disparu, et un seul utilise le variant CPV-2b. Le variant initial CPV-2 continue d'être utilisé aujourd'hui car il a été prouvé qu'il induit une protection croisée face aux nouveaux variants 2a, 2b et 2c, avec des concentrations en anticorps certes moins importantes pour les nouveaux variants, mais bien au-dessus des valeurs minimales requises. Cela a été démontré *in vitro* (Pratelli et al. 2001; Cavalli et al. 2008), mais également *in vivo* (Greenwood et al. 1995; Spibey et al. 2008). Ces preuves, notamment concernant le variant

CPV-2c, restent malgré tout discutées par certains auteurs (Hernández-Blanco, Catala-López 2015). De plus, des exemples d'infection au CPV-2c chez des adultes vraisemblablement correctement vaccinés avec le variant original CPV-2 existent. Cela a notamment été le cas en 2007 dans un élevage canin italien (Decaro et al. 2008).

Les vaccins contenant le variant CPV-2b ont également montré leur efficacité face aux autres variants (Wilson et al. 2014).

d. Les spécialités autorisées sur le marché français

A ce jour, l'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV) recense 27 vaccins ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France contre le parvovirus canin, dont le plus vieux date de 1982. La plupart d'entre eux sont combinés à d'autres valences : hépatite de Rubarth, maladie de carré, leptospirose ou rage. Quatre laboratoires se partagent le marché : Boehringer Ingelheim (avec leur gamme CANIGEN® et PARVIGEN®), MSD (avec leur gamme NOBIVAC®), Virbac (avec leur gamme EURICAN® et PRIMODOG®) et Zoetis (avec leur gamme VERSICAN® et VANGUARD®). Les différentes spécialités vaccinales sont résumées dans le Tableau 1.

Tout d'abord, il est à noter que seuls MSD et Zoetis proposent des vaccins à agents vivants atténués à haut titre. Ensuite, Boehringer Ingelheim, MSD et Virbac utilisent des souches de CPV-2 tandis que Zoetis utilise désormais une souche de CPV-2b. Ces vaccins possèdent une AMM pour une utilisation dès 6 semaines d'âge pour les chiots. En 2020, MSD a mis au point un nouveau vaccin qui est vivant atténué recombinant et qui possède une AMM pour une utilisation dès 4 semaines d'âge : le NOBIVAC DP PLUS®. Ce vaccin serait capable d'induire une immunité protectrice face à des niveaux élevés d'anticorps d'origine maternelle. La souche de parvovirus utilisée est la souche CPV-2 INT154 hautement immunogène classiquement employée dans la gamme NOBIVAC®, mais elle exprime désormais une protéine de capsid de CPV-2c. L'efficacité de ce nouveau vaccin ayant été établie chez des chiots issus de mères vaccinées avec la souche CPV-2 INT154, il semble donc nécessaire, dans les années à venir, de vérifier si ce vaccin est toujours efficace en présence d'AOM de chiennes vaccinées avec le NOBIVAC DP PLUS®. De plus, l'immunité induite par ce vaccin n'a pas été étudiée au-delà de 8 semaines (Pearce et al. 2023). Ce dernier est donc à réserver aux chiots de moins de 8 semaines d'âge et doit être couplé avec au moins une autre injection d'un vaccin différent.

Laboratoire	Gamme du vaccin	Souche de parvovirus	Titre en parvovirus	Année de 1ère mise sur le marché
Boehringer Ingelheim	CANIGEN®	CPV-2 780916	$10^5 - 10^7$ DICC ₅₀	1985
	PARVIGEN®	CPV-2 780916	$10^5 - 10^7$ DICC ₅₀	1982
	PRIMODOG®	CPV-2 780916	$10^{5,5}$ DICC ₅₀	1983
Virbac	EURICAN®	CPV-2 CAG2	$10^{4,9} - 10^{7,1}$ DICC ₅₀	1984
MSD	NOBIVAC®	CPV-2 INT154	$\geq 10^7$ DICC ₅₀	1986
	NOBIVAC DP PLUS®	CPV-2 630a	$10^{5,1} - 10^{6,7}$ DICC ₅₀	2020
Zoetis	VERSICAN®	CPV-2b Bio 12/B	$10^{4,3} - 10^{6,6}$ DICC ₅₀	2014
	VANGUARD®	CPV-2 NL 35D	$\geq 10^7$ DICC ₅₀	1995

Tableau 1 : Spécialités vaccinales disposants d'une AMM en France. D'après la Base de données publique des médicaments vétérinaires autorisés en France

e. Directives de vaccination canine contre le parvovirus canin

En 2024, le Comité de Directives de la Vaccination (CDV) de la World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) a mis à jour ses directives de vaccination datant de 2016 (M. J. Day et al. 2016). Un protocole vaccinal contre le parvovirus canin y est clairement défini afin de minimiser le risque d'infection. Concernant la primo-vaccination, le comité préconise que la première injection soit réalisée entre 6 et 8 semaines puis toutes les 2 à 4 semaines jusqu'à l'âge de 16 semaines. Ainsi, dans le cas le plus courant où un intervalle de 4 semaines est choisi entre chaque injection, quatre injections de primo-vaccination devront être administrées si la vaccination débute avant 8 semaines et seulement trois injections suffiront si la vaccination a débuté à 8 ou 9 semaines. La dernière injection de primo-vaccination doit être effectuée à 16 semaines ou plus. À noter que la vaccination avant 4-6 semaines est contre-indiquée en raison de risques d'hypoplasie cérébelleuse.

D'après le CDV le 1^{er} rappel de vaccin devrait se faire entre 6 mois et 1 an d'âge et de préférence le plus proche possible des 6 mois afin de réduire la fenêtre de sensibilité en cas de non réponse à la primo-vaccination. Cependant il est important de noter qu'actuellement, aucune donnée n'indique clairement qu'une interaction entre la vaccination et les anticorps d'origine maternelle soit possible après 16 semaines d'âge. D'ailleurs, les références bibliographiques utilisées pour justifier cette recommandation (Friedrich et Truyen, 2000; Thibault et al. 2016) sont en faveur d'une dernière injection de primo-vaccination à 16 semaines d'âge plutôt qu'à un premier rappel à 26 semaines.

Les chiens âgés de plus de 16 semaines au moment de leur primo-vaccination peuvent ne recevoir qu'une seule dose pour être correctement immunisés. Ensuite un rappel avant l'âge d'un an est également préconisé.

Enfin pour le reste du protocole vaccinal, une injection tous les 3 ans est recommandée (Squires et al. 2024).

Ces recommandations sont finalement identiques aux dernières directives alors que l'arrivée récente sur le marché du NOBIVAC® DP PLUS aurait pu modifier le protocole conventionnel de primo-vaccination. En effet la WSAVA ne se prononce pas encore sur l'utilisation de ce produit dès 4 semaines d'âge, considérant simplement qu'il « offre une protection similaire aux vaccins à agents vivants atténués ».

III. La réponse immunitaire antivirale à médiation cellulaire

La réponse immunitaire à médiation cellulaire fait partie de la réponse immunitaire adaptative aussi appelée immunité spécifique. Cette dernière entre en jeu après la réponse immunitaire innée qui est non spécifique et qui, en règle générale, permet d'éliminer 99,9 % des pathogènes. La réponse immunitaire adaptative fait donc face aux micro-organismes qui ont résisté à cette première ligne de défense immunitaire. Ce sont donc des pathogènes plus résistants, car mieux adaptés à leur hôte.

Le système immunitaire adaptatif enclenche une réaction antivirale lorsqu'il reçoit un signal médié par les interférons de type I.

1. Les interférons de type I : signal synonyme d'infection virale

Les interférons sont des cytokines. Ces molécules peuvent être synthétisées par toutes les cellules et servent de messagers dans la communication intercellulaire. Les interférons de type I (IFN-I) font partis de l'immunité non spécifique, mais permettent de faire le lien avec l'immunité adaptative. Ces derniers sont synthétisés par les cellules lorsqu'elles reçoivent un signal d'agression virale : l'attachement d'un virus à la membrane plasmique, la présence de génome viral dans le cytoplasme... Ainsi, la sécrétion d'IFN-I est synonyme d'infection virale. Toutes les cellules expriment le récepteur à l'IFN-I de manière constitutive, donc toutes les cellules peuvent réagir à ce signal. Les IFN-I ont une fonction autocrine et paracrine.

a. Effet autocrine

Dès que l'interféron est sécrété, il va se fixer sur les récepteurs avoisinants, dont ceux de la cellule productrice. Chez cette dernière, cela va déclencher une cascade aboutissant à l'activation d'environ 300 gènes à fonction antivirale, qui vont par exemple aboutir au blocage de la production protéique et des polymérase virales, à l'activation d'enzymes dégradant les ARN ou bloquant la transcription...

Enfin, la cellule va être capable d'autoévaluer l'efficacité des mécanismes mis en place et d'estimer s'ils sont insuffisants. Si c'est le cas, alors la fin de la signalisation induite par les IFN-I aboutit à l'apoptose de la cellule infectée. L'apoptose est un mécanisme de choix pour l'immunité antivirale. Elle permet une dégradation complète du matériel génétique de la cellule infectée (celui du virus compris) et ne s'accompagne pas d'une explosion de la cellule, évitant ainsi la dissémination du matériel viral. Dans le cas où les mécanismes mis en places sont suffisants pour arrêter l'infection de la cellule, celle-ci va tout simplement devenir réfractaire au virus.

b. Effet paracrine

Les IFN-I sécrétés par la cellule infectée vont diffuser dans le milieu interstitiel et se fixer aux cellules avoisinantes. Cette fixation va pré-engager les cellules dans la cascade évoquée précédemment. Cependant, pour éviter d'induire des apoptoses à tort, les cellules ne déclencheront la cascade d'activation que si elles reçoivent 2 signaux d'activation simultanés : la reconnaissance de l'IFN-I par le biais de son récepteur et la fixation du virus au contact de la cellule. Ainsi, les cellules entourant la cellule infectée vont devenir résistantes au virus

beaucoup plus rapidement et vont former une couronne de cellules réfractaires autour de la première cellule infectée, limitant ainsi la propagation du virus.

Les IFN-I ont également un effet paracrine sur les cellules appartenant au système immunitaire. En effet, leur fixation aux cellules dendritiques va d'une part permettre leur maturation en cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et d'autre part transmettre l'information que c'est à une infection virale que l'organisme est confronté.

2. L'interaction entre les pathogen recognition receptors (PRR) et les pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) : un autre signal d'infection virale

Les PRR sont des récepteurs exprimés par les cellules, principalement les CPA, à leur surface, dans le cytoplasme, le ribosome, le réticulum... Cela leur permet de détecter des pathogènes intra ou extra cellulaires. Leur fonction est de reconnaître des ligands particuliers : les PAMPs, retrouvés chez les micro-organismes. Les PAMPs sont des motifs antigéniques qui ont une très faible variabilité et qui sont très conservés par les micro-organismes. Ce sont des molécules différentes des molécules du soi. Parmi les PRR, nous pouvons citer les toll-like receptors (TLR), dont il existe plusieurs types, chacun étant spécifique d'un ligand bien particulier, spécifique d'un virus, une bactérie, un protozoaire... Ainsi les interactions PRR-PAMPs signalent à la cellule le type de pathogène auquel elle est confrontée.

Par la suite, les CPA, d'une part activées par les IFN-I et d'autre part qui ont reconnu le pathogène grâce à l'interaction PRR-PAMPs, vont migrer jusqu'au nœud lymphatique drainant la zone infectée.

3. Rôle des lymphocytes T CD4 dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire

Au sein des nœuds lymphatiques, les CPA présentent les antigènes aux lymphocytes T CD4 (LT CD4) via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe deux (CMH-II). Cette interaction associée à la synthèse de cytokines par la CPA va permettre la différenciation des LT CD4. Dans le cadre d'une infection virale, les cytokines sécrétées vont être des interleukines (IL) 12 et s'accompagnent également de la sécrétion d'IFN-I. L'ensemble de cette signalétique va aboutir à l'obtention de lymphocytes T helper 1 (LTh1) qui vont synthétiser des interférons gamma (IFN- γ). Ensuite Les LTh1 et les CPA vont interagir avec les lymphocytes T CD8 (LT

CD8). Les CPA présentent les antigènes aux LT CD8 via le CMH-I pour que les LT CD8 soient spécifiques du pathogène rencontré et les IFN- γ produits par les LTh1 permettent leur différenciation en cellules effectrices : les LT cytotoxiques (LTc). Les LTh1 activent aussi les lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes.

Les premières cellules activées effectrices de la réponse immunitaire à médiation cellulaire sont donc les LTh1. Ces derniers sont indispensables à l'activation des autres cellules effectrices, notamment par le biais de la sécrétion d'IFN- γ , qui est la cytokine essentielle de l'immunité cellulaire et de la lutte antivirale.

4. Rôle des LTc dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire

Les LTc sont attirés sur le lieu de l'infection par les chimiokines CXCL (CXC motif chemokine ligand) 9 et 10. Ensuite les LTc recherchent activement une cellule infectée qu'ils vont reconnaître grâce aux antigènes présents à sa surface. Les deux cellules vont se lier l'une à l'autre et le LTc va libérer des molécules de perforine et de granzyme par exocytose. Ce couple de molécule va activer un autre couple de protéines : les caspases initiatrices et effectrices qui vont enclencher le programme d'apoptose de la cellule infectée (Figure 3 et 4). Les LTc peuvent également induire l'apoptose des cellules par la voie des récepteurs de mort : des ligands du LTc se fixent à des récepteurs spécifiques, ce qui conduit à l'activation des caspases, puis à l'apoptose. Une fois la cellule infectée neutralisée, le LTc pourra répéter ces opérations avec de nouvelles cellules infectées.

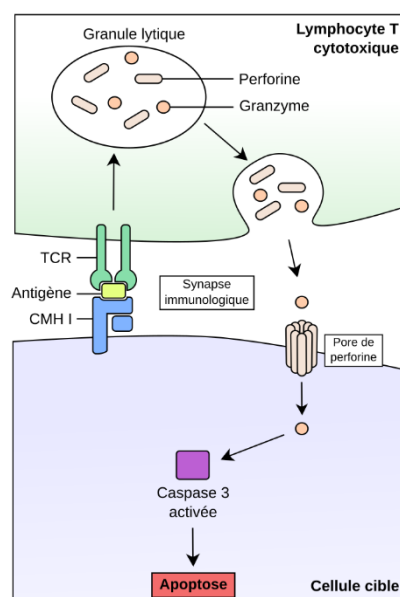


Figure 3 : Schéma simplifié de l'apoptose d'une cellule induite par le système perforine-granzyme d'un LTc. TCR signifie récepteur des lymphocytes T. D'après Calvez 2018.

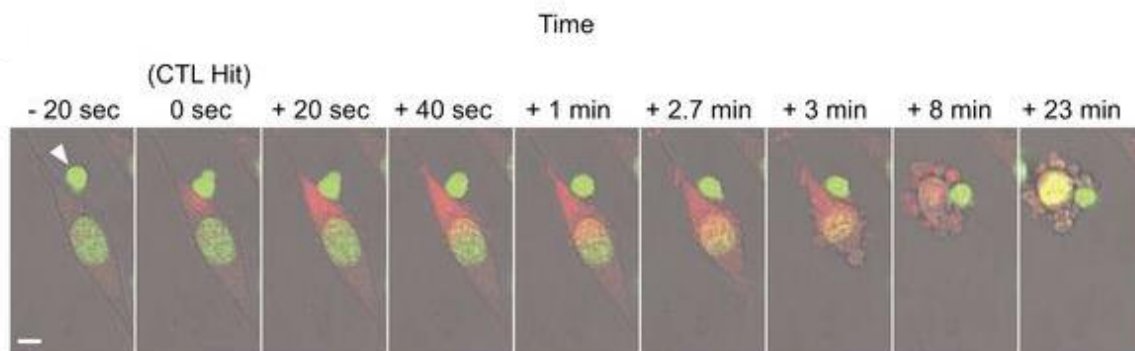


Figure 4 : Microscopie en fluorescence temporelle d'un lymphocyte T cytotoxique et d'une cellule cible de souris en présence de 100 μM de iodure de propidium (rouge) et 2,5 μM de colorant nucléaire vert SYTO 24. Les images sont acquises toutes les 20 secondes. La flèche blanche indique le LTc. Les images montrent la diffusion cytosolique des molécules des granules lytiques dans la cellule cible à partir du point de contact avec le LTc (0 seconde) jusqu'à l'apoptose de la cellule cible (3 à 23 minutes). Échelle, 10 μm . D'après Lopez et al. 2013.

5. Mise en mémoire des lymphocytes

Lorsque les antigènes commencent à se raréfier au sein de l'organisme certains lymphocytes sont mis en mémoire. Cela est vrai pour les LTh et les LTc. Cette mise en mémoire permettra une réponse plus rapide et plus importante lors d'une infection ultérieure. C'est la réponse immunitaire secondaire. C'est sur cette dernière qu'est basé le principe de vaccination.

On distingue les LT mémoires centraux et les LT mémoires effecteurs. Les premiers sont inactifs, mais activables rapidement lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène spécifique. C'est à partir d'eux que sont régénérés les effecteurs lors de la réponse secondaire. Ils recirculent en permanence dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils ont une très grande durée de vie. Ils sont dépendants de l'IL7 et l'IL15 pour leur survie et leur différenciation en effecteurs.

Les LT mémoires effecteurs sont activés et circulent dans les tissus. Ils permettent une protection immédiate dès l'entrée d'un pathogène mais leur durée de vie est plus réduite.

IV. Méthodes d'étude de la réponse immunitaire à médiation cellulaire

1. Stimulation de sang total ou stimulation des PBMC

Pour étudier la réponse immunitaire à médiation cellulaire, deux méthodes sont possibles : la stimulation de sang total ou la stimulation des PBMC. Les stimulations en elles-mêmes sont relativement similaires. Elles consistent à mélanger des agents pathogènes ou des antigènes,

dans un cas au sang total, dans un autre cas aux PBMC, dans le but de stimuler les cellules immunitaires sanguines. La différence réside dans la nature de la matrice stimulée. En effet, les PBMC correspondent seulement aux lymphocytes et aux monocytes et sont isolés de l'environnement sanguin habituel tandis que le sang total contient par définition toutes les cellules immunitaires. Ainsi, la stimulation de sang total se rapproche davantage des conditions *in vivo* puisque tous les types cellulaires sanguins sont présents dans le prélèvement, permettant ainsi d'éventuelles interactions entre eux, mais aussi avec les facteurs sériques. Au-delà de cette différence majeure chacune des méthodes présente des avantages et des inconvénients (Tableau 2). Par exemple le nombre de PBMC peut être choisi et ajusté tandis qu'avec du sang total la quantité de cellules est inhérente au volume du prélèvement. Cependant, l'isolement des PBMC est une méthode pouvant être longue et fastidieuse, qui retarde l'étape de stimulation, expose les cellules à un environnement non physiologique et peut induire une préactivation de ces dernières alors que l'utilisation de sang total permet de débiter les analyses immédiatement et donc de s'affranchir de tous ces biais en limitant au maximum les manipulations. En revanche, le sang total ne peut être cryoconservé, contrairement aux isolats de PBMC. Cela nécessite donc que les prélèvements soient traités rapidement et empêche ainsi la mise en place d'analyses ultérieures par lots.

	Whole blood assays	PBMC assays
Cell types	All blood cell types (including granulocytes, erythrocytes, and platelets)	PBMC populations
Cell numbers and composition	Adjustment of total cell number by blood volume used Immanent interindividual variation in cell type proportions High percentage of neutrophils, low number of smaller or rare populations	Total PBMC number adjustable Immanent interindividual variation in cell type proportions in PBMC fraction High percentage of T cells
(Cellular) interaction	Interactions between all blood cell types possible Interaction with serum factors (e.g. serum antibodies) possible Direct response to a stimulus or indirect response via signals derived from primary responding cell types; cell type specificity depending on readout	Interactions between PBMCs possible - Direct response to a stimulus or indirect response via signals derived from primary responding cell types; cell type specificity depending on the readout
Isolation process	Immediate start of assay possible	Isolation procedure delays start of assay and exposes cells to nonphysiological environment before the assay Cells might get preactivated through isolation process before assay
Storage	No/minimal processing steps before assay, reducing risk of preactivation due to handling; fragile granulocytes require extra careful handling of blood to avoid degranulation No cryopreservation of functional and viable granulocytes possible, immediate processing necessary	Isolation protocol can introduce unphysiological bias in cell type composition Cryopreservation and long-term storage possible
Experimental batches	The need for freshly drawn blood requires careful scheduling of blood donors across experimental groups to create interpretable batches of the stimulation as well as of downstream readouts conducted with viable cells	Frozen cells from multiple isolation procedures/multiple donors thawed at the same time can be used together for the assay
Physiological relevance	Closest to <i>in vivo</i> setting	Good representation of lymphocyte and monocyte compartment but more artificial soluble environment

Tableau 2 : Comparaison entre la stimulation de sang total et la stimulation de PBMC. D'après Müller et al. 2024.

De plus, la stimulation de sang total permet d'étudier les effets de perturbations *ex vivo* de manière sûre et contrôlée. Cette approche offre une meilleure compréhension des réponses immunitaires à des stimuli qui ne peuvent pas être administrés en toute sécurité à un être vivant

in vivo, ou à des processus imprévisibles comme les infections aiguës, où il est difficile de collecter des échantillons à un stade précoce.

Ces méthodes, bien que présentant des différences, sont pour autant toutes les deux valides pour étudier la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Damsgaard et al. 2009, Novak et al. 2023).

2. Protocoles de stimulation du sang total

La première occurrence de stimulation de sang total pour évaluer la réponse immunitaire à médiation cellulaire date de 1975 (Felsburg, Reilley, Sinnigen 1980) mais cette dernière a connu un nouvel essor avec la recherche autour des vaccins contre le SARS-CoV-2 et ses résultats ont été plus que probants. Cependant, il existe actuellement des disparités de protocoles. En effet, les milieux de culture, leurs concentrations, les témoins négatifs et les durées d'incubation changent d'une étude à l'autre. Par exemple, si beaucoup privilégient le milieu de culture Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 d'autres préfèrent utiliser l'Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM). Certains ajoutent également du sérum. Malgré tout, la plupart des études se rejoignent sur le fait d'ajouter des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) à leur milieu de culture. Les témoins négatifs contiennent du PBS (phosphate buffered salin) ou du DMSO (diméthylsulfoxyde). Le temps d'incubation varie de 15 à 24h (Zhao et al. 2024; Damsgaard et al. 2009; Kathrani, Hall 2019; Schwarz et al. 2022).

3. Protocoles d'isolement et de stimulation des PBMC

L'isolement des PBMC repose sur le principe de centrifugation par gradient de densité. Du sang, parfois dilué avec du PBS, est placé dans un tube contenant une solution de densité égale à 1,077. Cette solution est variable selon les études mais sa densité reste toujours la même. Par la suite le mélange est centrifugé. La durée et la vitesse de centrifugation est variable ou n'est pas toujours précisée dans la littérature mais il est important que la décélération soit lente pour ne pas perturber l'interface entre la solution de séparation et les PBMC. Par la suite la phase contenant les PBMC est récupérée et est soumise à un ou plusieurs lavages. Pour ces derniers différents produits sont utilisés mais une association de RPMI 1640, de sérum fœtal, de pénicilline et de streptomycine est couramment employée. Ces derniers sont également utilisés en tant que milieu de culture. La durée de culture et de stimulation des PBMC est, une fois encore, très variable mais dure, le plus souvent, 24 à 72 heures. Dans les cas où la culture ou la stimulation dépassent les 24 heures, le milieu de culture est régulièrement remplacé ou

complémenté (Rodrigues et al. 2009; Rolland-Turner, Farré, Boué 2006; Novak et al. 2023; Hartley, Tarleton 2015; Chamizo, Moreno, Alvar 2005).

4. Différentes méthodes de quantification et d'évaluation de la qualité de la réponse immunitaire

a. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux nécessite au préalable d'isoler les PBMC. Elle permet d'identifier chaque famille de leucocyte présent dans un prélèvement et de les dénombrer. Cette technique est basée sur les propriétés optiques (diffusion, réfraction) intrinsèques des cellules ou particules couplées à une analyse de la fluorescence obtenue par des marquages spécifiques. Cette méthode est l'une des plus sensible et spécifique, mais a le désavantage d'être chronophage.

b. ELISA

Suite à la période d'incubation, le surnageant des échantillons peut être récupéré afin de réaliser des tests ELISA. Ces derniers permettent d'identifier les cytokines et chimiokines présentes dans le prélèvement et de les quantifier (Schwarz et al. 2022). Il existe de nombreux automates utilisant des variantes de la technologie ELISA. La référence dans le domaine a longtemps été l'automate ELISpot (Enzyme-Linked Immuno Spot) qui utilise la technique d'immunospot. Le principe repose sur la capture de molécules sécrétées par des cellules sur un support solide sensibilisé. Une fois les cellules éliminées, les immunocomplexes sont révélés par une méthode ELISA qui utilise un substrat chromogène insoluble. La précipitation localisée de ce substrat produit des taches colorées, appelées immunospots (Janetzki, Rabin 2015). Cette méthode présente l'avantage d'être sensible et reproductible, mais nécessite de nombreuses manipulations qui complexifient son utilisation et empêchent son utilisation dans des études à grande échelle incluant de nombreux prélèvements. De nouveaux automates : ELLA et Olink présentent des sensibilités et spécificités similaires, mais sont plus simples d'utilisation et ont donc un meilleur rendement (respectivement $\geq 0,90$ et $\geq 0,80$) (Schwarz et al. 2022).

c. RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction)

Après stimulation du sang total ou des PBMC, il est possible d'étudier la réaction immunitaire à médiation cellulaire en réalisant des RT-qPCR ciblant des gènes impliqués dans cette immunité. Il existe alors deux méthodes possibles, toutes les deux décrites et comparées en 2022 (Schwarz et al. 2022). La première méthode nécessite un traitement préalable afin de lyser

les hématies de l'échantillon, d'extraire les molécules d'ARN et de les purifier. Les RT-qPCR sont ensuite réalisées. La seconde méthode consiste à réaliser les RT-qPCR directement sur le prélèvement sanguin stimulé. L'inconvénient principal de la RT-qPCR est qu'elle ne permet d'évaluer que l'expression des gènes impliqués dans l'immunité, et non pas la production des effecteurs protéiques.

d. Tests à base de billes

Ce type de test repose sur les principes de la cytométrie en flux fluorescente ou de la microscopie fluorescente quantitative. Les échantillons de sang total stimulés sont déposés dans des puits qui contiennent jusqu'à 80 billes qui ont chacune une affinité pour une protéine particulière grâce à des anticorps spécifiques de la protéine en question. Ensuite, les protéines se lient aux billes. Des anticorps marqués par fluorescence et ayant une affinité pour toutes les protéines sont ajoutés. Deux lasers sont ensuite utilisés. Un premier reconnaît les billes, tandis que le second mesure l'intensité de la fluorescence, donc la quantité de protéines liées à la bille et donc par extension la quantité de protéines dans l'échantillon. Ainsi, on peut savoir quelles protéines sont présentes dans un échantillon et dans quelles quantités (Luminex Platform Technology - FR). Cette méthode a notamment été utilisée par Lesueur et al. en 2022. C'est une technique multiplex coûteuse, mais qui permet d'analyser à la fois un grand nombre d'échantillons et un grand nombre de cytokines ou chimiokines.

5. Quels marqueurs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire étudier ?

Pour étudier la réponse immunitaire à médiation cellulaire nous avons fait le choix d'utiliser des RT-qPCR. Nous allons donc nous concentrer sur les marqueurs qui peuvent être quantifiés par cette technique.

a. Les gènes induits par l'IFN- γ : des biomarqueurs de choix

Tout d'abord, il est important d'identifier les gènes dont la transcription serait corrélée à la réponse immunitaire à médiation cellulaire et plus précisément corrélée à la présence et l'activation des LT. Pour cela, en 2022, des chercheurs ont réalisé un profil transcriptionnel du sang total stimulé par des peptides du SARS-CoV-2 chez des individus : naïfs, guéris de la COVID-19 (coronavirus disease 2019) ou vaccinés contre le virus (Schwarz et al. 2022). Ce transcriptome a été établi grâce à la méthode de séquençage Illumina. Un autre transcriptome a

également été réalisé sans stimulation, mais avec simplement la solution contrôle de DMSO, afin de connaître l'expression basale des gènes. De cette étude préliminaire, il ressort que 410 gènes sont activés par la stimulation du sang total : 224 chez les individus guéris de la COVID-19 et 307 chez les individus vaccinés. Parmi ces gènes, 121 sont communs aux deux groupes, soit environ 30%. De plus, parmi ces derniers, ceux associés à la réponse immunitaire à médiation cellulaire induite par la voie de signalisation de l'IFN- γ sont significativement plus nombreux. Cela est donc le témoin de l'activation des LT spécifiques des antigènes utilisés lors de la stimulation. Par la suite, six gènes ont été sélectionnés afin d'étudier leur expression par PCR : CXCL10, ANKRD22 (ankyrin repeat domain 22), GBP1 (guanylate binding protein 1), CXCL9, IL2 et IFN- γ . Ces gènes ont été choisis car ils étaient en lien avec l'expression de l'IFN- γ et qu'ils étaient les gènes dont l'expression différentielle par rapport au témoin était la plus forte (Figure 5).

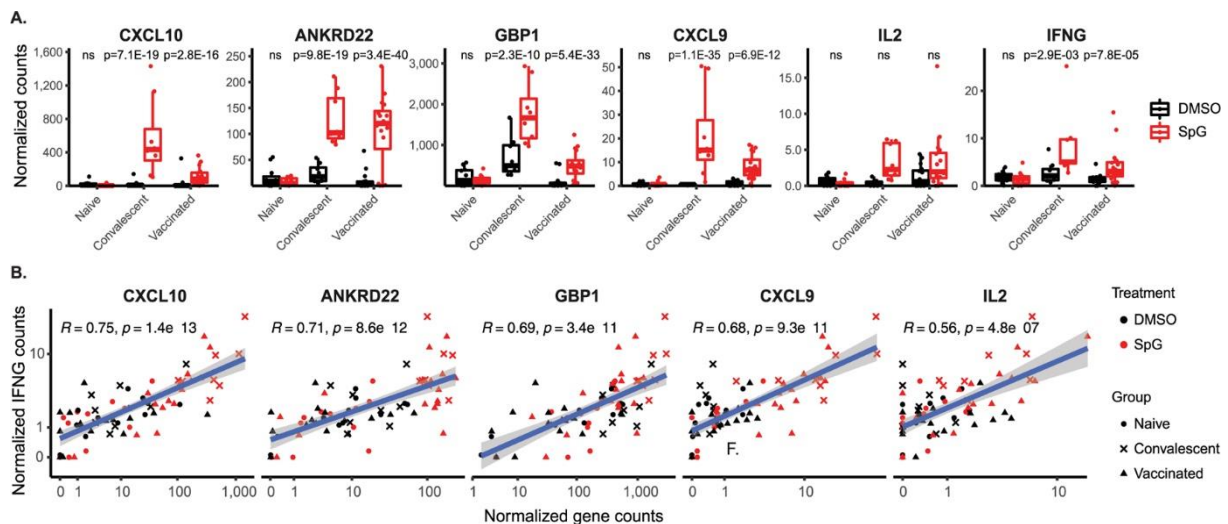


Figure 5 : **A.** Dénombrement normalisé des gènes candidats sélectionnés pour la validation en aval en fonction de l'expression différentielle par rapport au DMSO. Les comparaisons montrent une significativité calculée à l'aide de DESeq2 (bilatéral) et corrigée à l'aide de la méthode Benjamini-Hochberg. Naïf, N = 11 ; convalescent N = 8 ; vacciné, N = 16 échantillons biologiquement indépendants. **B.** Corrélation entre le gène candidat et l'expression de l'IFN- γ (dénombrement normalisé des gènes). Le traitement et le groupe sont respectivement indiqués par une couleur et un symbole (voir la légende). La corrélation R et les p-values ont été calculées à l'aide de l'indice de Spearman. Les bandes grises représentent l'intervalle de confiance à 95 % du modèle linéaire. D'après Schwarz et al. 2022.

L'étude a également examiné les variations d'expression des gènes qui pourraient exister pour un même échantillon analysé plusieurs fois. Ainsi, parmi les six gènes testés, CXCL10 est celui dont les mesures d'expression étaient les moins variables. Il est donc le biomarqueur de la réponse immunitaire à médiation cellulaire le plus fiable pour des analyses par PCR. À noter que la protéine IP-10 (interferon gamma-induced protein 10), codée par le gène CXCL10, est un marqueur beaucoup moins fiable, car elle est abondamment stockée dans les neutrophiles et

monocytes sans qu'il y ait pour autant de réaction immunitaire à médiation cellulaire et donc production d'IFN- γ .

b. Les fonctions de CXCL10

CXCL10 est sécrétée par différents types cellulaires : essentiellement les monocytes mais aussi les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Schwarz et al. 2022 ; Dyer et al. 2009; Luster, Ravetch 1987 ; Lo et al. 2010). Cette production est activée par l'IFN- γ . CXCL10 se lie aux récepteurs CXCR3 (CXC motif chemokine receptor 3) qui sont présents à la surface des LT, des cellules natural killers (NK), des macrophages, des lymphocytes B et des cellules dendritiques. Ces récepteurs possèdent deux isoformes A et B. Le premier a un effet activateur en favorisant la migration cellulaire sur les lieux d'une inflammation et la prolifération des leucocytes, tandis que le deuxième a la fonction inverse, inhibant les processus cités précédemment (Elemam, Talaat, Maghazachi 2022).

B. Étude expérimentale

I. Matériel et méthode

1. Donneurs et prélèvements des échantillons

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique Science et santé animales numéro 115, sous le numéro SSA_2022_017.

Les prélèvements de sang total ont été réalisés sur trois groupes d'individus différents. Aucun des chiens ne présentait d'antécédent de parvovirose. Le premier groupe était constitué de trois chiens, jeunes adultes (entre 2 et 3 ans), de races et de sexes différents : une femelle croisée montagne des Pyrénées/berger allemand (individu 1) et un mâle golden retriever (individu 2) et un mâle retriever de la Nouvelle-Écosse (individu 3). Tous les trois ont été correctement vaccinés contre le parvovirus. Ils ont reçu une primo-vaccination en trois injections dont la dernière effectuée à 16 semaines d'âge, puis un rappel 1 an plus tard. Les vaccins utilisés sont précisés dans le Tableau 3.

Le deuxième groupe comportait une chienne fox terrier à poil dur de 5 ans (individu 4), une chienne pinscher nain croisée border collie de 9 mois (individu 5) et un chien créole de 11 ans (individu 6).

Le troisième groupe était constitué de quatre chiots golden retriever (deux mâles et deux femelles) de 16 semaines ayant reçu deux injections de primo-vaccination.

	Primo-vaccination	Dernier rappel
Individu 1	CANIGEN®	VERSICAN®
Individu 2	EURICAN®	EURICAN®
Individu 3	CANIGEN® et EURICAN®	EURICAN®
Individu 4	NOBIVAC®	NOBIVAC®
Individu 5	NOBIVAC®	Pas encore effectué
Individu 6	EURICAN®	NOBIVAC®
3^{ème} groupe	NOBIVAC®	Pas encore effectué

Tableau 3 : Protocoles de vaccination des individus ayant participé à l'étude

3 mL de sang ont été prélevés à la veine céphalique dans un tube hépariné stérile.

2. Stimulation du sang total

a. Expérience 1 : utilisation de concentrations en peptides de CPV faibles à modérées

Cette première expérience a été réalisée avec les individus du groupe 1. Sous une hotte, 500 µL de sang ont été mélangés à 100 µL de RPMI, de la pénicilline et de la streptomycine de sorte à avoir une concentration finale de 1%, et de la BSA (Bovine Serum Albumin) de manière à obtenir une concentration finale de 0,2%. Trois conditions ont été testées : une stimulation avec des peptides (JPT Peptide Technologies, Berlin, Allemagne) correspondant à la protéine VP2 du parvovirus canin (à trois concentrations différentes : 1 µg/mL, 5 µg/mL et 10 µg/mL ; toutes les trois proches des concentrations utilisées par Lesueur et al. en 2022), un témoin positif stimulé à la concanavaline A (5 µg/mL) (Arneth 2010; Martínez-Orellana et al. 2017) et un témoin négatif non stimulé. Selon les conditions dans chaque puits a été ajouté respectivement : 0,6 µL de peptides, 3 µL de peptides, 6 µL de peptides, 1,2 µL de concanavaline A et 3 µL de DMSO. Ces mélanges ont ensuite été mis dans un incubateur à 38°C pendant 16h (Figure 6).

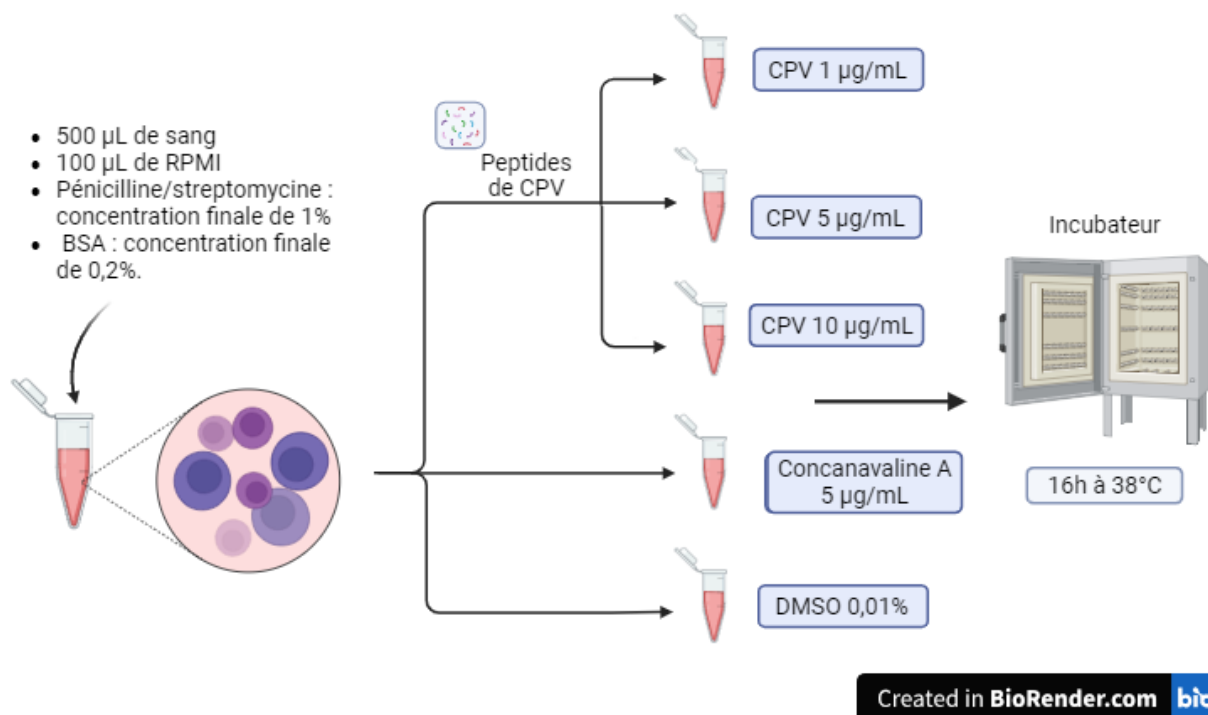


Figure 6 : Schéma du protocole expérimental 1

b. Expérience 2 : utilisation de fortes concentrations en peptides de CPV

Cette deuxième expérience a également été réalisée avec les individus du groupe 1. La stimulation précédente n'induisant pas une expression suffisante du gène CXCL10 nous avons émis l'hypothèse que la quantité de peptides utilisés était peut-être trop faible pour stimuler correctement le sang total. Il a donc été décidé de renouveler l'expérience en augmentant la concentration en peptides. Ainsi le protocole est identique à l'expérience précédente mais cette fois des concentrations en peptides de 50 et 100 µg/mL ont été testées pour stimuler le sang total associées respectivement à 62 et 32 µL de RPMI. De plus un nouveau paramètre a été mis en place en ajoutant au mélange réactionnel initial du vaccin PRIMODOG® qui contient la souche vivante atténuée 780916 du CPV-2 de telle sorte à avoir 500 DICC₅₀ (Figure 7). L'objectif était de déterminer si le virus vivant atténué induit une stimulation du sang total.

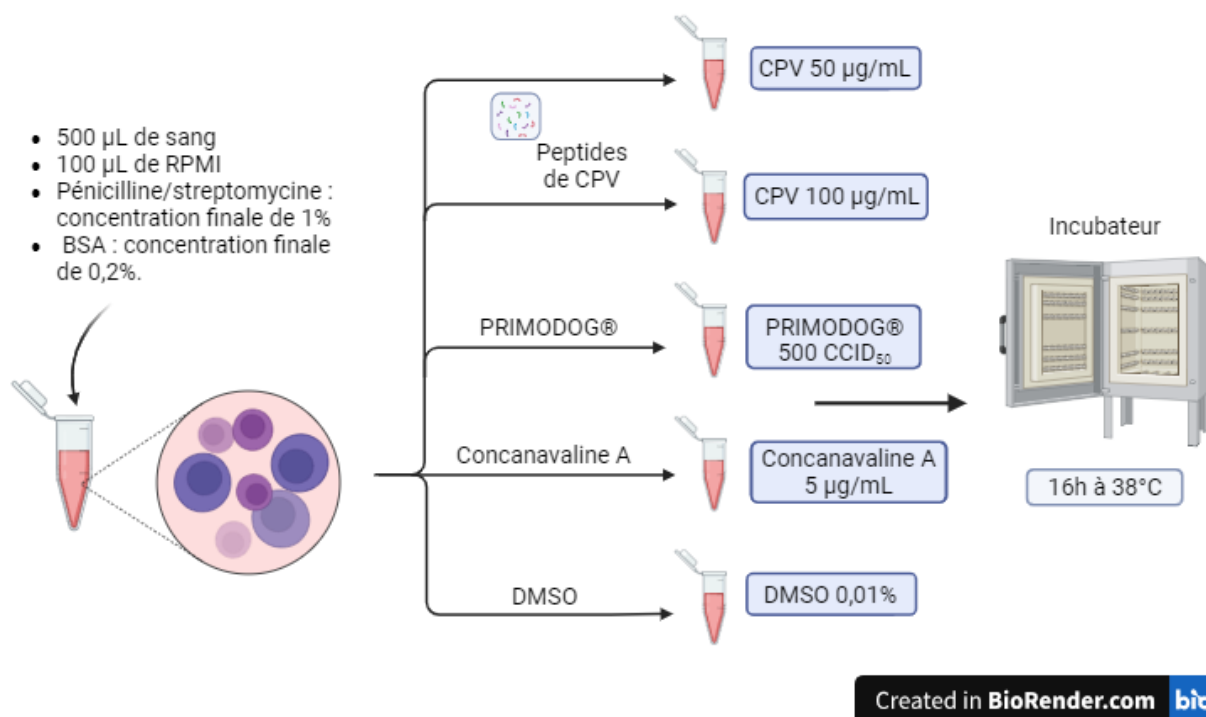


Figure 7 : Schéma du protocole expérimental 2

3. Isolation des PBMC et stimulation

a. Isolation des PBMC

L'expression du gène CXCL10 étant toujours insuffisante nous avons émis l'hypothèse qu'il était peut-être nécessaire d'isoler les PBMC avant de réaliser la stimulation. La quantité de cellules immunitaires obtenue serait alors bien supérieure à la quantité présente dans seulement 500 μL de sang.

Nous avons dilué 2 mL de sang dans 4 mL de PBS, puis ajouté 6 mL de Ficoll directement au fond du tube. Le tout a été centrifugé à 650 rcf pendant 10 minutes à température ambiante. Il est important de respecter une accélération et une décélération lente. L'anneau blanc situé entre le Ficoll et le plasma est récupéré et mélangé à 50 mL de PBS. Ensuite le mélange est centrifugé 10 minutes à 220 rcf à 12°C puis le surnageant est éliminé en retournant le tube. Le comptage cellulaire alors effectué donne une quantité de cellules de l'ordre de quelques millions par millilitre. On réalise ensuite un ensemencement en P12 avec $4 \cdot 10^6$ cellules par puits. Le milieu de culture contient du RPMI 10%, du sérum de veau fœtal (SVF), 1% P/S et de l'amphotéricine B à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Après 24 heures de culture les PBMC sont prêtes à être stimulées (Figure 8).

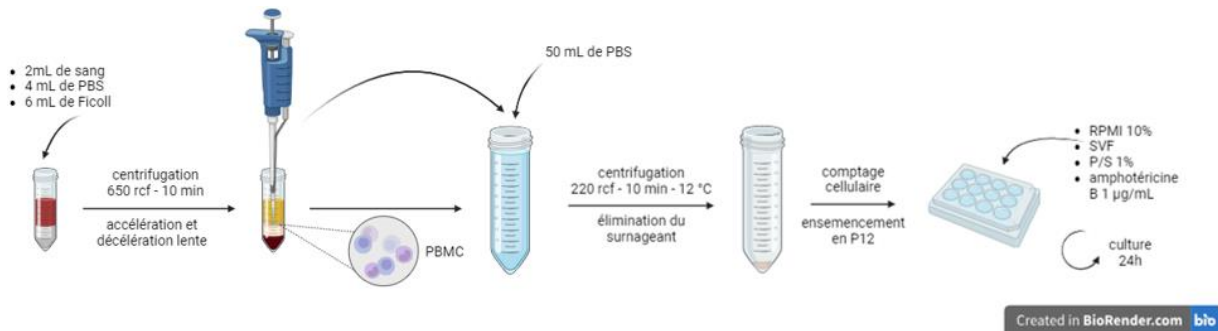


Figure 8 : Schéma du protocole d'isolation des PBMC

b. Expérience 3 : stimulation des PBMC

Cette troisième expérience a été réalisée avec les individus du groupe 2. Pour la stimulation des concentrations en peptides de 1, 5 et 10 µg/mL ont été testées. La solution contenant les peptides a directement été ajoutée à 1 mL du milieu de culture des PBMC. Les mêmes témoins ont été utilisés que dans l'expérience précédente à savoir un témoin positif contenant 5µg/mL de concanavaline A (Ritt et al. 2015; Rolland-Turner, Farré, Boué 2006), un autre avec 500 DICC₅₀ correspondant à la souche du vaccin PRIMODOG® et un dernier témoin négatif complétement en DMSO. Le tout a été placé dans un incubateur à cellules à 38°C dans 5% de dioxyde de carbone (CO₂) pendant 24 heures (Figure 9).

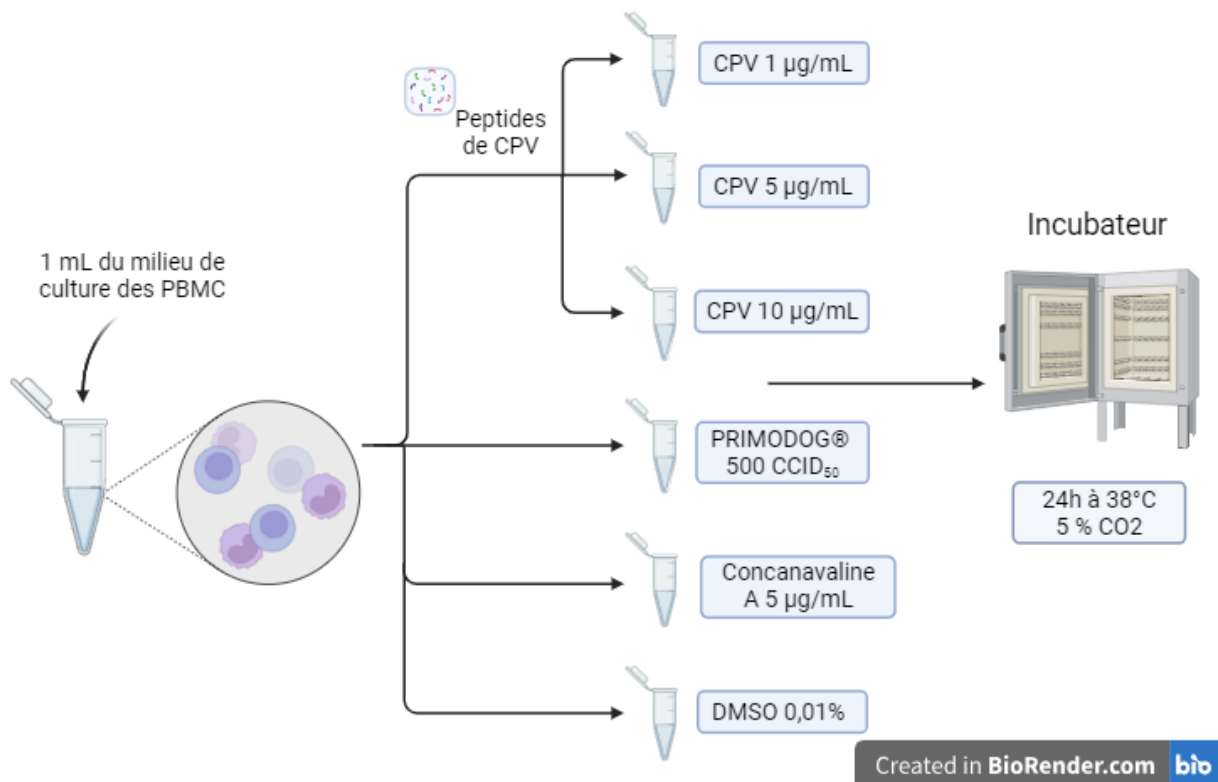


Figure 9 : Schéma du protocole expérimental 3

c. Expérience 4 : utilisation de jeunes individus en cours de primo-vaccination

Cette quatrième expérience a été réalisée avec les individus du groupe 3. L'expérience précédente n'étant toujours pas concluante, nous avons émis l'hypothèse qu'après une injection de vaccin contre le parvovirus canin, la quantité de cellules immunitaires circulantes spécifiques du virus devenait rapidement trop faible pour que l'on puisse induire une stimulation suffisante. Nous avons donc réalisé une dernière expérience sur des chiots de 16 semaines en cours de primo-vaccination ayant reçu une première dose à 8 semaines et une nouvelle à 12 semaines afin d'optimiser la quantité de leucocytes circulants spécifiques du virus. Le protocole est identique à celui de l'expérience précédente à l'exception que le paramètre PRIMODOG® n'a pas été renouvelé.

4. Extraction d'ARN

Les différents mélanges ont été transférés dans des colonnes d'extraction d'ARN et traités selon les instructions du fabricant (NucleoSpin RNA Blood kit ; Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) à partir de 200µL de sang total.

5. RTq-PCR

L'expression des gènes CXCL10 et GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) a été étudiée grâce à la réalisation de RT-qPCR sur un LightCycler® 96 (Roche) en plaques 96 puits contenant un volume final de 10 µL préparés selon les instructions du fabricant (iTaQ™ Universal SYBR® Green One-Step Kit). Les échantillons contenant de l'héparine, un inhibiteur connu des polymérase, il a été décidé dans un premier temps, lors de l'expérience 1, de réaliser les RT-qPCR sur les échantillons purs et dilués au dixième afin de déterminer laquelle de ces méthodes donnait les meilleurs résultats. La quantification relative a été faite en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ en utilisant comme gène de ménage pour la normalisation le gène GAPDH. Les séquences des amorces utilisées sont décrites dans le tableau 4.

Gène	Direction de la séquence de l'amorce	Séquence de l'amorce	Référence
CXCL10	sens	CTT GAA TGA ACC AAA GTG CTG TTC	Karlsson et al. 2015
	antisens	ACA GCG TAT AGT TCT AGA GAG AGG	
GAPDH	sens	TTC CAC GGC ACA GTC AAG	Menezes-Souza et al. 2012
	antisens	ACT CAG CAC CAG CAT CAC	

Tableau 4 : Amorces utilisées pour les RT-qPCR

II. Résultats

1. Expérience 1

Que l'on utilise des échantillons purs ou dilués au dixième, la stimulation du sang total avec des concentrations en peptides de CPV de 1, 5 ou 10 µg/mL n'induit aucune augmentation de l'expression du gène CXCL10 par rapport au témoin non stimulé. Il n'y a pas non plus, entre ces concentrations, d'expressions significativement différentes. En revanche, la concanavaline A permet bien une augmentation de l'expression du gène CXCL10 par rapport au témoin négatif. De plus, il semblerait que lorsqu'on dilue les échantillons au dixième avant de procéder aux RT-qPCR on obtienne une stimulation légèrement plus importante (Figure 10). Par la suite, les échantillons ont systématiquement été dilués au dixième avant de faire les RT-qPCR.

Les concentrations testées en peptides de CPV ne permettent donc pas une stimulation efficace du sang total.

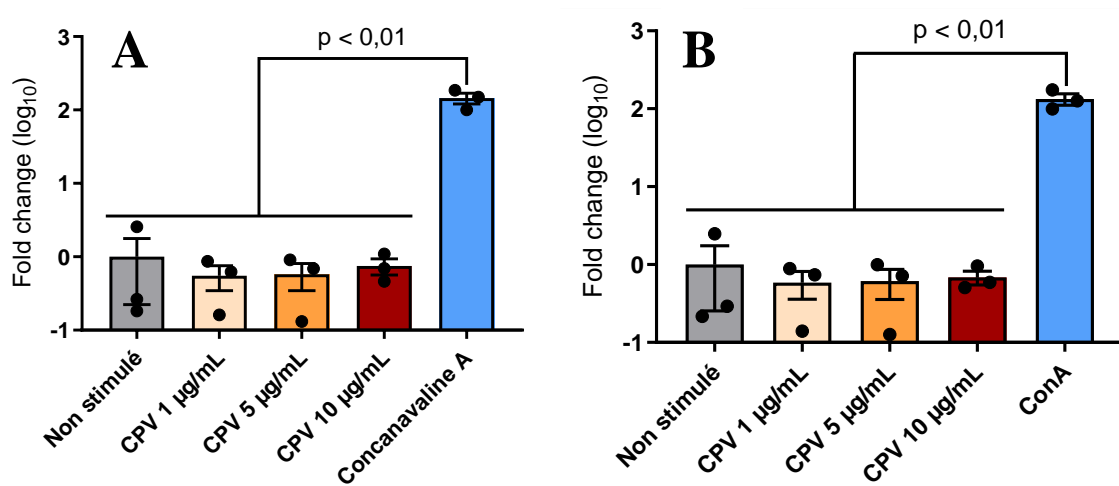


Figure 10 : Expression du gène CXCL10. A. RT-qPCR réalisées sur des échantillons dilués au dixième. B. RT-qPCR réalisées sur des échantillons non dilués. Les niveaux d'expression du gène CXCL10 ont été normalisés en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Student. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne

2. Expérience 2

La stimulation du sang total avec des concentrations plus élevées en peptides de CPV (50 et 100 µg/mL) n'induit pas une expression plus importante du gène CXCL10 par rapport au témoin non stimulé (Figure 4). De plus, la stimulation à l'aide du vaccin PRIMODOG® ne montre, elle aussi, aucune différence significative par rapport au témoin négatif et aux stimulations par les peptides viraux (Figure 11).

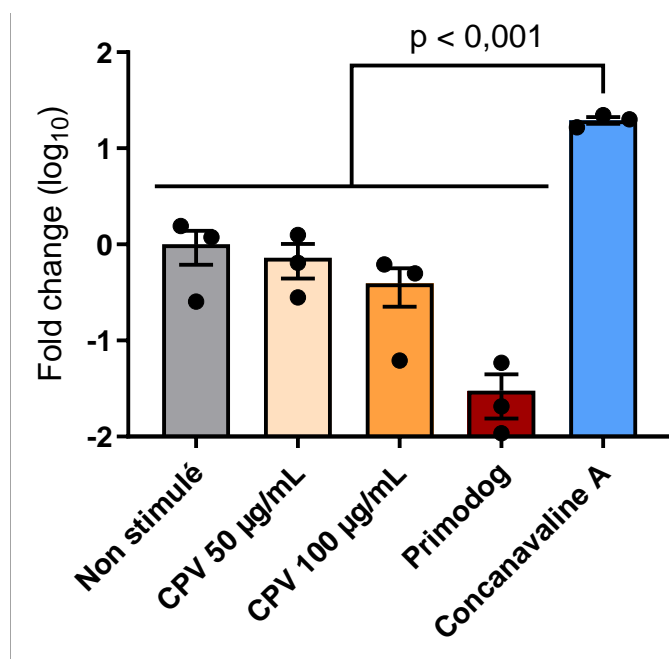


Figure 11 : Expression du gène CXCL10. Les niveaux d'expression du gène CXCL10 ont été normalisés en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Student. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne.

3. Expérience 3

La stimulation des PBMC par des concentrations en peptides de CPV de 1, 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$ n'induit pas d'augmentations significatives de l'expression du gène CXCL10 par rapport au témoin non stimulé. Cependant, les stimulations au PRIMODOG® et à la concanavoline A permettent bien d'augmenter l'expression du gène CXCL10 par rapport aux autres tests et ceux de manière plus importante encore pour la concanavoline A (Figure 12).

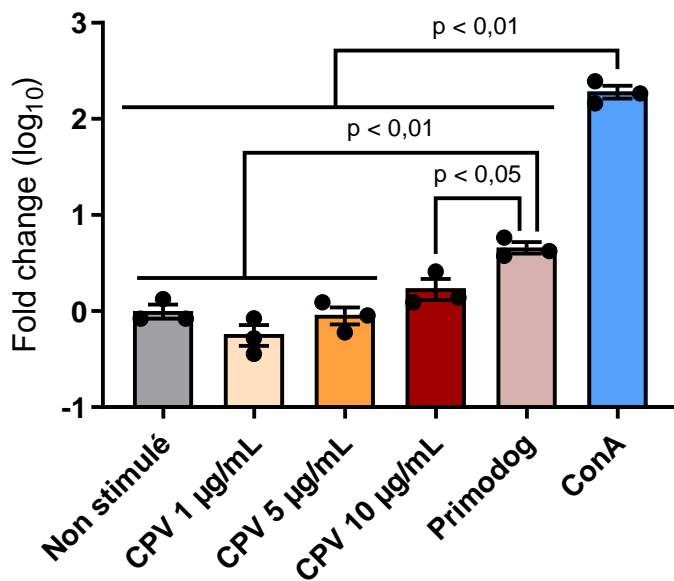


Figure 12 : Expression du gène CXCL10. Les niveaux d'expression du gène CXCL10 ont été normalisés en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Student. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne.

4. Expérience 4

Aucun test n'a donné de résultats significativement différents des autres (Figure 13). Cependant, il est à noter que chez le chiot 1, l'expression du gène CXCL10 est d'autant plus importante que la concentration en peptides utilisée pour stimuler le sang est forte (Figure 14).

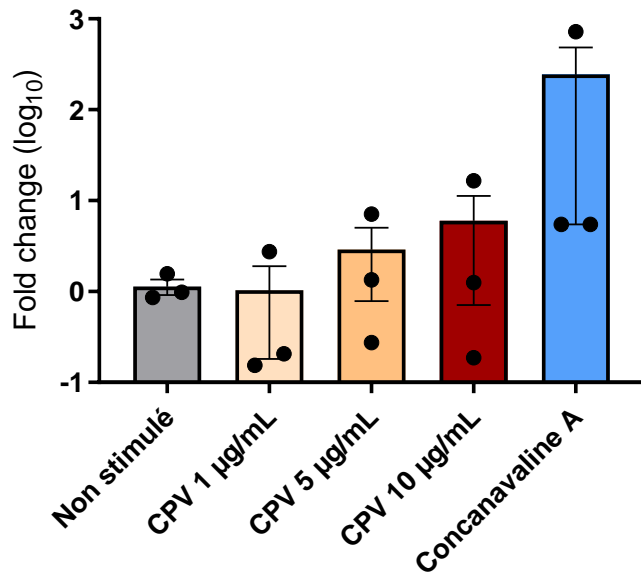


Figure 13 : Expression du gène CXCL10. Les niveaux d'expression du gène CXCL10 ont été normalisés en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Student. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne.

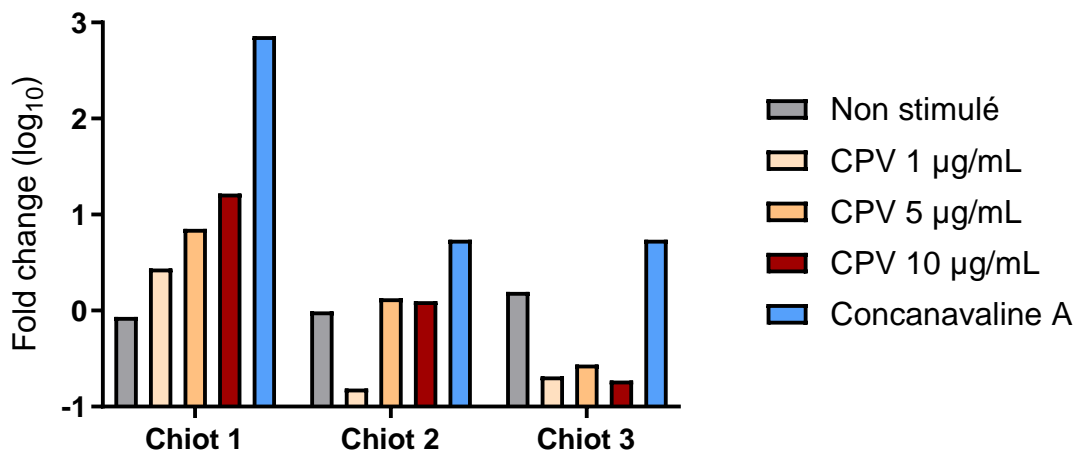


Figure 14 : Expression du gène CXCL10. Les niveaux d'expression du gène CXCL10 ont été normalisés en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

III. Discussion

1. Les peptides viraux ne semblent pas permettre la stimulation du sang total lors des trois premiers protocoles

Au cours de la première expérience, nous n'avons pas réussi à stimuler le sang total de sorte à obtenir une expression accrue du gène CXCL10. Les concentrations en peptides viraux

employées étaient pourtant égales ou jusqu'à plus de 3 fois supérieures à celles décrites comme efficaces dans la littérature (Lesueur et al. 2022).

Nous avons donc décidé de réaliser le même protocole en augmentant significativement les concentrations en peptides de CPV (50 et 100 µg/mL) et en ajoutant un nouveau paramètre : une stimulation avec le vaccin PRIMODOG®. Nos résultats montrent, alors que les concentrations en peptides de CPV utilisées ainsi que le virus vivant atténué ne stimulent pas suffisamment le sang pour induire une augmentation significative de l'expression du gène CXCL10. De plus, l'utilisation du vaccin PRIMODOG® n'induit aucune différence significative dans l'expression du gène CXCL10 par rapport à l'utilisation de peptides viraux. Il est surprenant que l'utilisation du virus vivant atténué ne parvienne pas à stimuler les monocytes et donc les lymphocytes du sang total. En effet, lors de cette expérience, les conditions *in vitro* se rapprochent des conditions *in vivo* d'un rappel de vaccination. Rappel de vaccination qui, par définition, permet de réactiver la réponse immunitaire adaptative dont fait partie la réaction immunitaire à médiation cellulaire. La différence majeure étant que dans notre expérimentation le virus se retrouve directement dans le sang, environnement différent du tissu sous cutané dans lequel est habituellement injecté le vaccin.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la concentration en peptides de CPV n'était pas le facteur limitant de nos expériences mais que ce dernier pouvait être la quantité de cellules immunitaires sensibles à la stimulation présente dans notre volume de réaction. Ainsi, par la suite, il a été décidé d'isoler les PBMC de nos prélèvements et de les mettre en culture avant de procéder aux différentes stimulations afin d'obtenir un nombre de cellules potentiellement sensibles plus important.

Notre premier essai de stimulation des PBMC a donné des résultats relativement similaires à l'expérience 1. En effet, le témoin positif augmente très significativement l'expression du gène CXCL10 par rapport aux autres conditions testées tandis que les stimulations à l'aide des peptides de CPV n'induisent aucune augmentation significative de la production de l'ARNm (ARN messenger) en question. Ainsi, l'utilisation des PBMC ne suffit pas à obtenir des quantités d'ARNm de CXCL10 plus importantes. Il convient également de noter que la stimulation avec le vaccin PRIMODOG® a induit, cette fois-ci, une expression du gène CXCL10 accrue par rapport au témoin non stimulé et aux tests de stimulation par les peptides. La présence de monocytes en quantité plus importante que dans le sang total pourrait en partie expliquer ce résultat. En effet, il est possible d'imaginer que les monocytes qui font partie des CPA peuvent

reconnaitre les PAMPs du virus vivant atténué via leurs PRR et les présenter aux lymphocytes LT CD4 et LT CD8 initiant leur différenciation et leur activation malgré l'absence de cytokine et d'autres facteurs d'activation. Cela n'est possible que parce que le virus est entier, les peptides viraux n'étant pas des PAMPs.

2. Un dernier protocole aux résultats ininterprétables

Nous avons émis une dernière hypothèse pour tenter d'expliquer les résultats précédents et mettre en place une ultime expérience. Il se pourrait que, rapidement après une vaccination, le nombre de cellules immunitaires circulantes, après avoir augmenté, diminue fortement. Ainsi, pour optimiser le nombre de cellules immunitaires circulantes nous avons choisi de prélever de jeunes individus en cours de primo-vaccination donc ayant reçu une dose de vaccin contre le parvovirus canin il y a 4 semaines maximum. Malheureusement, le témoin positif n'ayant pas fonctionné, il est impossible d'interpréter les résultats. Notons, tout de même, que les résultats obtenus pour le chiot 1 sont encourageants. En effet, pour cet individu, l'expression du gène CXCL10 est d'autant plus importante que la concentration en peptides viraux utilisée est élevée. Rappelons que les chiots prélevés pour cette expérience ont été vaccinés contre le parvovirus canin à 8 puis 12 semaines d'âge. Ainsi il est possible que lors de ces 2 premières injections le taux d'AOM ait été encore trop élevé entraînant un échec vaccinal et donc une non activation de la réaction immunitaire primaire et par conséquent l'absence de mise en mémoire de cellules immunitaires. Cela pourrait éventuellement expliquer pourquoi les résultats obtenus pour les chiots 2 et 3 ne sont pas concluants. Afin d'obtenir des résultats interprétables il semble donc nécessaire de renouveler cette expérience avec un nombre d'échantillons plus élevé et une mesure du taux d'AOM lors de la dernière vaccination ou une mesure du taux d'anticorps anti CPV le jour du prélèvement. Cela n'a pas été fait ici faute de temps.

3. La stimulation de sang totale est indépendante de la concentration en peptides utilisée

Nous ne sommes pas parvenus à stimuler de manière concluante le sang total de chien malgré les diverses méthodes employées. Pourtant, cette technique a déjà fait ses preuves chez plusieurs autres espèces notamment l'humain (Schwarz et al. 2022) et la vache (Lesueur et al. 2022) et nous avons essayé de reproduire au mieux les protocoles connus pour ces espèces tout en adaptant notre méthode aux moyens dont nous disposions et à notre choix de travailler avec du sang canin. Nous avons démontré, malgré tout, que la stimulation du sang total ne dépend

pas de la concentration en peptides utilisée. Cependant, il est intéressant de noter que si l'utilisation de peptides n'a pas permis de stimuler le sang total de manière satisfaisante, l'utilisation du vaccin PRIMODOG® a quant à lui induit avec succès une stimulation. Ainsi il semble possible d'évaluer la réponse vaccinale à médiation cellulaire en utilisant des vaccins comme moyens de stimulation. Cependant, cette méthode serait beaucoup plus coûteuse que l'utilisation de peptides et serait donc un frein à son utilisation à grande échelle. De plus, il ne serait pas possible d'évaluer la réponse immunitaire à médiation cellulaire en dehors du cadre d'une maladie pour laquelle un vaccin existe. L'utilisation de peptides viraux aurait permis de s'affranchir de toutes ces limites dans le cas où nos résultats auraient été concluants.

4. La stimulation des PBMC : une méthode aux résultats variables

La stimulation des PBMC provenant de sang canin est une méthode régulièrement utilisée mais dont les résultats sont assez variables malgré l'emploi de protocoles expérimentaux relativement similaires. Certaines études ont donné des résultats de stimulation mitigés dépendant notamment des cytokines d'intérêt et du temps d'incubation (Valli et al. 2010). D'autres ont obtenu des résultats incohérents (Schmitz et al. 2013) mais certains sont malgré tout parvenus à avoir des résultats encourageants (Novak et al. 2023). Par exemple, l'objectif de cette dernière étude était d'évaluer la qualité de la réponse vaccinale contre la leptospirose avant et après un rappel annuel. Pour évaluer la réponse immunitaire à médiation cellulaire, dans un premier temps, les PBMC étaient isolées puis stimulées avec différents sérovars de *Leptospira interrogans* ou mélangées avec seulement du milieu de culture en guise de témoin négatif. Ensuite, la quantité de cytokines : CXCL10, IL17 et IFN- γ était mesurée à l'aide d'un test à base de billes reposant sur les principes de la cytométrie en flux fluorescente. Même si étudier la stimulation des PBMC n'était pas l'objectif de l'étude, il est possible, grâce aux différents résultats, d'en tirer des conclusions. Il ressort alors que la stimulation augmente significativement la quantité d'IL17 et d'IFN- γ mais pas de CXCL10. Il est donc possible de stimuler des PBMC. Concernant le cas de CXCL10, les résultats obtenus par cette étude ne signifient pas forcément que notre choix d'utiliser ce gène était inadapté. En effet, dans cet exemple c'est la quantité de protéines codées par le gène CXCL10 qui a été mesurée. Or, comme expliqué précédemment, la protéine IP-10 codée par le gène CXCL10 est abondamment stockée dans les monocytes sans qu'il y ait pour autant de réaction immunitaire à médiation cellulaire. Cela en fait donc un marqueur beaucoup moins fiable. De plus, l'étude menée par Schwarz et al. en 2022, bien que réalisée sur du sang humain, mettait en évidence le fait que

l'ARNm de CXCL10 était le marqueur le plus adapté à l'étude de la réaction immunitaire à médiation cellulaire.

D'autres paramètres, tel que le temps d'incubation, peuvent influencer nos résultats et sont donc également à prendre en compte. Une étude s'est par exemple intéressée à la quantité de cytokines produites par les PBMC à 4, 24, 48 et 72 heures post stimulation par des agents pathogènes (Valli et al. 2010). Les résultats ont montré que la quantité de cytokines produites était très variable en fonction du temps et de la cytokine considérée. Il semblerait donc que la stimulation des PBMC induise une production de cytokines *in vitro* très dynamique et que, par conséquent, des observations uniques peuvent être trompeuses et difficilement interprétables. On peut également penser que les réponses *in vivo* peuvent être encore plus complexes.

5. Des expériences préliminaires avec un nombre d'échantillons limité

Les résultats doivent néanmoins être nuancés au vu du faible nombre d'individus prélevés pour réaliser les expériences. En effet, pour chaque protocole, nous avons utilisé le sang de seulement 3 ou 4 chiens. Cela s'explique par le fait que ces expérimentations devaient être préliminaires à d'autres à plus grande échelle et devaient permettre de mettre au point un protocole valide et fonctionnel. Un plus grand nombre d'échantillons aurait peut-être permis d'obtenir des résultats plus concluants notamment lors de notre dernière expérience.

6. La stimulation de sang total par des peptides viraux : une méthode simple et rapide pouvant se démocratiser

La stimulation du sang total par des peptides viraux est une méthode qui ne nécessite que peu de temps et de matériels. Ainsi elle présentait un fort potentiel de développement au sein des cliniques vétérinaires à l'heure où la q-PCR se démocratise de plus en plus avec des automates simples d'utilisation. A terme, si la méthode avait fonctionné, les praticiens auraient eu un outil très utile au quotidien pour évaluer la réponse vaccinale, parfois entravée par les AOM. Cela aurait également pu aboutir à de nombreuses autres valorisations comme l'étude des effets immuno-modulateurs de l'anesthésie, du stress chirurgical, ou de certains médicaments, les conséquences de l'obésité, des maladies chroniques ou encore l'étude de l'immuno-sénescence du chien âgé. Malheureusement, il semblerait que notre méthode fonctionne mal ou de manière erratique chez le chien empêchant tout cela.

7. Des stratégies innovantes permettent de s'affranchir de l'interférence des AOM lors de la vaccination

Afin de limiter les échecs vaccinaux dus aux AOM de nouveaux types de vaccins sont développés. C'est le cas notamment du NOBIVAC DP PLUS® qui est vivant atténué recombinant et qui possède une AMM pour une utilisation dès 4 semaines d'âge. Ce vaccin contient une souche de CPV2 modifiée pour exprimer une protéine de capsid de CPV-2c. Il est ainsi capable d'induire une immunité protectrice face à des titres en AOM plus élevés que tous les autres vaccins disponibles sur le marché français. Du moins cela a été prouvé chez des chiots issus de mères vaccinées avec la souche CPV-2 non modifiée. Il est donc légitime de se demander si ce nouveau vaccin sera aussi efficace chez des chiots dont la mère aura elle-même été vaccinée avec le NOBIVAC DP PLUS®.

On peut également s'attendre à un essor du développement des vaccins à ARNm. Pour le moment, nous ne savons pas dans quelle mesure cette technologie permettra de s'affranchir de l'interférence avec les AOM canins, mais le seul vaccin vétérinaire commercialisé pour le moment, le vaccin contre le virus influenza aviaire H5N1, a donné des résultats prometteurs chez les canards. L'agent de ce vaccin est un ARNm auto-répliquatif et contrairement à ce qui se passe en cas d'utilisation d'une souche vivante atténuée, la présence d'AOM n'empêche pas la réplication et l'augmentation de la quantité d'antigène. Si un tel vaccin devait voir le jour contre la parvovirose canine, il est tout à fait possible que l'interférence soit moindre qu'avec les vaccins actuels voire inexistante.

Conclusion

Aucune des méthodes utilisées dans notre étude ne permet d'évaluer la réponse vaccinale à médiation cellulaire chez le chien. Plusieurs explications sont possibles : la trop grande variabilité de production de notre marqueur (le gène CXCL10) ou l'incapacité à stimuler le sang total ou les PBMC. En effet, la production de cytokines étant très variable en fonction du temps, et ce même en situation de stimulation, elles reflètent difficilement l'intensité de la réaction immunitaire à médiation cellulaire. La deuxième explication pourrait résider en l'absence de cellules immunitaires circulantes spécifiques du CPV. Malgré tout, lors de notre dernière expérience, un des trois chiots étudiés a donné des résultats concluants, suggérant que

cette dernière méthode pourrait être fonctionnelle. Malheureusement, cette expérimentation souffre du fait que nous ignorons si les premières injections de vaccination reçues par les chiots ont induit une immunité efficace contre le CPV. Il serait donc intéressant de renouveler cette expérience avec des animaux dont le statut immunitaire face au parvovirus canin est connu.

Bibliographie

ARNETH, Borros M., 2010. Measurement of T cell activation after 16-hr in vitro stimulation with concanavalin A. *Current Protocols in Cytometry*. janvier 2010. Vol. Chapter 6, pp. Unit 6.28.1-10. DOI 10.1002/0471142956.cy0628s51.

Base de données publique des médicaments vétérinaires autorisés en France - data.gouv.fr, [sans date]. [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.data.gouv.fr/fr/datasets/base-de-donnees-publique-des-medicaments-veterinaires-autorises-en-france-1/> [Consulté le 14 mai 2024].

BOROBIA, Alberto M., CARCAS, Antonio J., PÉREZ-OLMEDA, Mayte, CASTAÑO, Luis, BERTRAN, María Jesús, GARCÍA-PÉREZ, Javier, CAMPINS, Magdalena, PORTOLÉS, Antonio, GONZÁLEZ-PÉREZ, María, GARCÍA MORALES, María Teresa, ARANA-ARRI, Eunáte, ALDEA, Marta, DÍEZ-FUERTES, Francisco, FUENTES, Inmaculada, ASCASO, Ana, LORA, David, IMAZ-AYO, Natale, BARÓN-MIRA, Lourdes E., AGUSTÍ, Antonia, PÉREZ-INGIDUA, Carla, GÓMEZ DE LA CÁMARA, Agustín, ARRIBAS, José Ramón, OCHANDO, Jordi, ALCAMÍ, José, BELDA-INIESTA, Cristóbal, FRÍAS, Jesús, et COMBIVACS STUDY GROUP, 2021. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet (London, England)*. 10 juillet 2021. Vol. 398, n° 10295, pp. 121-130. DOI 10.1016/S0140-6736(21)01420-3.

BUONAVOGLIA, C., TOLLIS, M., BUONAVOGLIA, D. et PUCCINI, A., 1992. Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. octobre 1992. Vol. 15, n° 4, pp. 281-283. DOI 10.1016/0147-9571(92)90007-E.

BUONAVOGLIA, Canio, MARTELLA, Vito, PRATELLI, Annamaria, TEMPESTA, Maria, CAVALLI, Alessandra, BUONAVOGLIA, Domenico, BOZZO, Giancarlo, ELIA, Gabriella, DECARO, Nicola et CARMICHAEL, Leland, 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology*. 1 décembre 2001. Vol. 82, n° 12, pp. 3021-3025. DOI 10.1099/0022-1317-82-12-3021.

BURTONBOY, S., CHARLIER, P., HERTOOGHS, J., LOBMANN, M., WISEMAN, A. et WOODS, S., 1991. Performance of high titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody. *Veterinary Record*. 20 avril 1991. Vol. 128, n° 16, pp. 377-381. DOI 10.1136/vr.128.16.377.

CALDERON, Marina Gallo, MATTION, Nora, BUCAFUSCO, Danilo, FOGEL, Fernando, REMORINI, Patricia et LA TORRE, Jose, 2009. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *Journal of Virological Methods*. août 2009. Vol. 159, n° 2, pp. 141-145. DOI 10.1016/j.jviromet.2009.03.013.

CALVEZ, Mathilde, 2018. Les lymphocytes T cytotoxiques : de véritables tueurs ? *Planet-Vie* [en ligne]. 27 septembre 2018. Disponible à l'adresse : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/systeme-immunitaire/les-lymphocytes-t-cytotoxiques-de-veritables-tueurs> [Consulté le 12 août 2024].

CAVALLI, Alessandra, MARTELLA, Vito, DESARIO, Costantina, CAMERO, Michele, BELLACICCO, Anna Lucia, DE PALO, Pasquale, DECARO, Nicola, ELIA, Gabriella et BUONAVOGLIA, Canio, 2008. Evaluation of the Antigenic Relationships among Canine Parvovirus Type 2 Variants. *Clinical and Vaccine Immunology*. mars 2008. Vol. 15, n° 3, pp. 534-539. DOI 10.1128/CVI.00444-07.

CHAMIZO, Cristina, MORENO, Javier et ALVAR, Jorge, 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 10 janvier 2005. Vol. 103, n° 1, pp. 67-75. DOI 10.1016/j.vetimm.2004.08.010.

DAMSGAARD, Camilla T., LAURITZEN, Lotte, CALDER, Philip C., KJÆR, Tanja M. R. et FRØKLÆR, Hanne, 2009. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines — A comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. *Journal of Immunological Methods*. 30 janvier 2009. Vol. 340, n° 2, pp. 95-101. DOI 10.1016/j.jim.2008.10.005.

DAY, M. J., HORZINEK, M. C., SCHULTZ, R. D. et SQUIRES, R. A., 2016. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* [en ligne]. janvier 2016. Vol. 57, n° 1. DOI 10.1111/jsap.2_12431. [Consulté le 30 mai 2024].

DECARO, N., BUONAVOGLIA, C. et BARRS, V. R., 2020. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Veterinary Microbiology*. août 2020. Vol. 247, pp. 108760. DOI 10.1016/j.vetmic.2020.108760.

DECARO, Nicola, DESARIO, Costantina, ELIA, Gabriella, MARTELLA, Vito, MARI, Viviana, LAVAZZA, Antonio, NARDI, Manuela et BUONAVOGLIA, Canio, [sans date]. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. .2008.

DOKI, M, FUJITA, K, MIURA, R, YONEDA, M, ISHIKAWA, Y, TANENO, A et KAI, C, 2006. Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolated from domestic dogs in Japan in 1999 and 2000. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. juillet 2006. Vol. 29, n° 4, pp. 199-206. DOI 10.1016/j.cimid.2006.05.001.

DRAKE, John W., 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. [en ligne]. 1991. [Consulté le 30 mai 2024].

DYER, Kimberly D., PERCOPO, Caroline M., FISCHER, Elizabeth R., GABRYSZEWSKI, Stanislaw J. et ROSENBERG, Helene F., 2009. Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. *Blood*. 24 septembre 2009. Vol. 114, n° 13, pp. 2649-2656. DOI 10.1182/blood-2009-01-199497.

ELEMAM, Noha Mousaad, TALAAT, Iman Mamdouh et MAGHAZACHI, Azzam A., 2022. CXCL10 Chemokine: A Critical Player in RNA and DNA Viral Infections. *Viruses*. 3 novembre 2022. Vol. 14, n° 11, pp. 2445. DOI 10.3390/v14112445.

FELSBURG, P.J., REILLEY, M.T. et SINNIGEN, J.K., 1980. A rapid microtechnique for in vitro stimulation of canine lymphocytes using whole blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. août 1980. Vol. 1, n° 3, pp. 251-261. DOI 10.1016/0165-2427(80)90026-4.

FRIEDRICH, K. et TRUYEN, U., 2000. Efficacy of parvovirus vaccines and effectiveness of two vaccination protocols. *Praktische Tierarzt*. 1 décembre 2000. Vol. 81, pp. 988-994.

GREENWOOD, N., CHALMERS, W., BAXENDALE, W. et THOMPSON, H., 1995. Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine

efficacy against field strains. *Veterinary Record*. 21 janvier 1995. Vol. 136, n° 3, pp. 63-67. DOI 10.1136/vr.136.3.63.

HARBISON, Carole E., CHIORINI, John A. et PARRISH, Colin R., 2008. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends in Microbiology*. 1 mai 2008. Vol. 16, n° 5, pp. 208-214. DOI 10.1016/j.tim.2008.01.012.

HARTLEY, Ashley N. et TARLETON, Rick L., 2015. Chemokine receptor 7 (CCR7)-expression and IFN γ production define vaccine-specific canine T-cell subsets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 avril 2015. Vol. 164, n° 3, pp. 127-136. DOI 10.1016/j.vetimm.2015.02.001.

HERNÁNDEZ-BLANCO, Beatriz et CATALA-LÓPEZ, Ferrán, 2015. Are licensed canine parvovirus (CPV2 and CPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in puppies?: A systematic review of controlled clinical trials. *Veterinary Microbiology*. octobre 2015. Vol. 180, n° 1-2, pp. 1-9. DOI 10.1016/j.vetmic.2015.07.027.

HORECKA, Kevin, PORTER, Steve, AMIRIAN, E. Susan et JEFFERSON, Ellen, 2020. A Decade of Treatment of Canine Parvovirus in an Animal Shelter: A Retrospective Study. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*. 29 mai 2020. Vol. 10, n° 6, pp. 939. DOI 10.3390/ani10060939.

HUEFFER, Karsten, PARKER, John S. L., WEICHERT, Wendy S., GEISEL, Rachel E., SGRO, Jean-Yves et PARRISH, Colin R., 2003. The Natural Host Range Shift and Subsequent Evolution of Canine Parvovirus Resulted from Virus-Specific Binding to the Canine Transferrin Receptor. *Journal of Virology*. février 2003. Vol. 77, n° 3, pp. 1718-1726. DOI 10.1128/JVI.77.3.1718-1726.2003.

IHALAINEN, Teemu O., NISKANEN, Einari A., JYLHÄVÄ, Juulia, PALOHEIMO, Outi, DROSS, Nicolas, SMOLANDER, Hanna, LANGOWSKI, Jörg, TIMONEN, Jussi et VIHINEN-RANTA, Maija, 2009. Parvovirus induced alterations in nuclear architecture and dynamics. *PloS One*. 17 juin 2009. Vol. 4, n° 6, pp. e5948. DOI 10.1371/journal.pone.0005948.

JANETZKI, Sylvia et RABIN, Rachel, 2015. Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot) for Single-Cell Analysis. In : SINGH, Anup K. et CHANDRASEKARAN, Aarthi (éd.), *Single Cell*

Protein Analysis [en ligne]. New York, NY : Springer New York. pp. 27-46. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-2986-3. [Consulté le 23 mai 2024].

KARLSSON, Iulia, HAGMAN, Ragnvi, GUO, Yongzhi, HUMBLLOT, Patrice, WANG, Liya et WERNERSSON, Sara, 2015. Pathogenic *Escherichia coli* and lipopolysaccharide enhance the expression of IL-8, CXCL5, and CXCL10 in canine endometrial stromal cells. *Theriogenology*. 1 juillet 2015. Vol. 84, n° 1, pp. 34-42. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.02.008.

KATHRANI, Aarti et HALL, Edward, 2019. A preliminary study assessing cytokine production following ex vivo stimulation of whole blood with diet in dogs with chronic enteropathy. *BMC Veterinary Research* [en ligne]. 2019. Vol. 15. DOI 10.1186/s12917-019-1940-7. [Consulté le 22 mai 2024].

LESUEUR, Jérémy, WALACHOWSKI, Sarah, BARBEY, Sarah, CEBRON, Nathan, LEFEBVRE, Rachel, LAUNAY, Frédéric, BOICHARD, Didier, GERMON, Pierre, CORBIERE, Fabien et FOUCRAS, Gilles, 2022. Standardized Whole Blood Assay and Bead-Based Cytokine Profiling Reveal Commonalities and Diversity of the Response to Bacteria and TLR Ligands in Cattle. *Frontiers in Immunology*. 23 mai 2022. Vol. 13, pp. 871780. DOI 10.3389/fimmu.2022.871780.

LING, Monika, NORRIS, Jacqueline M., KELMAN, Mark et WARD, Michael P., 2012. Risk factors for death from canine parvoviral-related disease in Australia. *Veterinary Microbiology*. 17 août 2012. Vol. 158, n° 3, pp. 280-290. DOI 10.1016/j.vetmic.2012.02.034.

LO, Blanche Ka Ki, YU, Mei, ZLOTY, David, COWAN, Bryce, SHAPIRO, Jerry et MCELWEE, Kevin John, 2010. CXCR3/Ligands Are Significantly Involved in the Tumorigenesis of Basal Cell Carcinomas. *The American Journal of Pathology*. mai 2010. Vol. 176, n° 5, pp. 2435-2446. DOI 10.2353/ajpath.2010.081059.

LOPEZ, Jamie A., SUSANTO, Olivia, JENKINS, Misty R., LUKOYANOVA, Natalya, SUTTON, Vivien R., LAW, Ruby H. P., JOHNSTON, Angus, BIRD, Catherina H., BIRD, Phillip I., WHISSTOCK, James C., TRAPANI, Joseph A., SAIBIL, Helen R. et VOSKOBOINIK, Iliia, 2013. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*. 4 avril 2013. Vol. 121, n° 14, pp. 2659-2668. DOI 10.1182/blood-2012-07-446146.

Luminex Platform Technology - FR, [sans date]. [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/antibodies/immunoassays/procartaplex-assays-luminex/features.html> [Consulté le 23 mai 2024].

LUSTER, Andrew D. et RAVETCH, Jeffrey V., 1987. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *The Journal of Experimental Medicine*. 1 octobre 1987. Vol. 166, n° 4, pp. 1084-1097.

MARTÍNEZ-ORELLANA, Pamela, QUIROLA-AMORES, Paulina, MONTSERRAT-SANGRÀ, Sara, ORDEIX, Laura, LLULL, Joan, ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, Alejandra et SOLANO-GALLEGO, Laia, 2017. The inflammatory cytokine effect of Pam3CSK4 TLR2 agonist alone or in combination with *Leishmania infantum* antigen on ex-vivo whole blood from sick and resistant dogs. *Parasites & Vectors*. 13 mars 2017. Vol. 10, n° 1, pp. 123. DOI 10.1186/s13071-017-2062-3.

MEERS, J, KYAW-TANNER, M, BENSINK, Z et ZWIJNENBERG, R, 2007. Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 2007. Vol. 85, n° 10, pp. 392-396. DOI 10.1111/j.1751-0813.2007.00206.x.

MENEZES-SOUZA, Daniel, GUERRA-SÁ, Renata, CARNEIRO, Cláudia Martins, VITORIANO-SOUZA, Juliana, GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro, TEIXEIRA-CARVALHO, Andréa, SILVEIRA-LEMOS, Denise, OLIVEIRA, Guilherme Corrêa, CORRÊA-OLIVEIRA, Rodrigo et REIS, Alexandre Barbosa, 2012. Higher Expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 Chemokines in the Skin Associated with Parasite Density in Canine Visceral Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 10 avril 2012. Vol. 6, n° 4, pp. e1566. DOI 10.1371/journal.pntd.0001566.

MÜLLER, F. T. et FREULING, C. M., 2018. Rabies control in Europe: an overview of past, current and future strategies. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. août 2018. Vol. 37, n° 2, pp. 409-419. DOI 10.20506/rst.37.2.2811.

MÜLLER, Sophie, KRÖGER, Charlotte, SCHULTZE, Joachim L. et ASCHENBRENNER, Anna C., 2024. Whole blood stimulation as a tool for studying the human immune system. *European Journal of Immunology*. 2024. Vol. 54, n° 2, pp. 2350519. DOI 10.1002/eji.202350519.

NELSON, Christian D.S., PALERMO, Laura S., HAFENSTEIN, Susan L. et PARRISH, Colin R., 2007. Different mechanisms of antibody-mediated neutralization of parvoviruses revealed using the Fab fragments of monoclonal antibodies. *Virology*. 10 mai 2007. Vol. 361, n° 2, pp. 283-293. DOI 10.1016/j.virol.2006.11.032.

NOVAK, Andreja, HINDRIKS, Esther, HOEK, Aad, VERAART, Claire, BROENS, Els M., LUDWIG, Irene, RUTTEN, Victor, SLOOTS, Arjen et BROERE, Femke, 2023b. Cellular and humoral immune responsiveness to inactivated *Leptospira interrogans* in dogs vaccinated with a tetravalent *Leptospira* vaccine. *Vaccine*. 4 janvier 2023. Vol. 41, n° 1, pp. 119-129. DOI 10.1016/j.vaccine.2022.11.017.

PALERMO, Laura M., HAFENSTEIN, Susan L. et PARRISH, Colin R., 2006. Purified Feline and Canine Transferrin Receptors Reveal Complex Interactions with the Capsids of Canine and Feline Parvoviruses That Correspond to Their Host Ranges. *Journal of Virology*. septembre 2006. Vol. 80, n° 17, pp. 8482-8492. DOI 10.1128/JVI.00683-06.

PARRISH, C R, AQUADRO, C F, STRASSHEIM, M L, EVERMANN, J F, SGRO, J Y et MOHAMMED, H O, 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology*. décembre 1991. Vol. 65, n° 12, pp. 6544-6552.

PARRISH, C. R., HAVE, P., FOREYT, W. J., EVERMANN, J. F., SENDA, M. et CARMICHAEL, L. E., 1988. The Global Spread and Replacement of Canine Parvovirus Strains. *Journal of General Virology*. 1 mai 1988. Vol. 69, n° 5, pp. 1111-1116. DOI 10.1099/0022-1317-69-5-1111.

PARRISH, Colin R, 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*. septembre 1999. Vol. 69, n° 1-2, pp. 29-40. DOI 10.1016/S0378-1135(99)00084-X.

PARRISH, Colin R., O'CONNELL, Priscilla H., EVERMANN, James F. et CARMICHAEL, Leland E., 1985. Natural Variation of Canine Parvovirus. *Science*. 1985. Vol. 230, n° 4729, pp. 1046-1048.

PEARCE, Jacqueline, SPIBEY, Norman, SUTTON, David et TARPEY, Ian, 2023. Development of a Novel Canine Parvovirus Vaccine Capable of Stimulating Protective

Immunity in Four-Week-Old Puppies in the Face of High Levels of Maternal Antibodies. *Vaccines*. 18 septembre 2023. Vol. 11, n° 9, pp. 1499. DOI 10.3390/vaccines11091499.

POLLARD, Andrew J. et BIJKER, Else M., 2021. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*. février 2021. Vol. 21, n° 2, pp. 83-100. DOI 10.1038/s41577-020-00479-7.

POULET, H., JAS, D., LEMETER, C., COUPIER, C. et BRUNET, S., 2008. Efficacy of a bivalent inactivated non-adjuvanted feline calicivirus vaccine: relation between in vitro cross-neutralization and heterologous protection in vivo. *Vaccine*. 4 juillet 2008. Vol. 26, n° 29-30, pp. 3647-3654. DOI 10.1016/j.vaccine.2008.04.082.

PRATELLI, Annamaria, CAVALLI, Alessandra, MARTELLA, Vito, TEMPESTA, Maria, DECARO, Nicola, CARMICHAEL, Leland Eugene et BUONAVOGLIA, Canio, 2001. Canine Parvovirus (CPV) Vaccination: Comparison of Neutralizing Antibody Responses in Pups after Inoculation with CPV2 or CPV2b Modified Live Virus Vaccine. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. mai 2001. Vol. 8, n° 3, pp. 612-615. DOI 10.1128/CDLI.8.3.612-615.2001.

RITT, Michelle G., LINDBORG, Beth A., O'BRIEN, Timothy D., BISIGNANO, Joseph et MODIANO, Jaime F., 2015. Stimulation with Concanavalin-A Induces IL-17 Production by Canine Peripheral T Cells. *Veterinary Sciences*. 10 avril 2015. Vol. 2, n° 2, pp. 43-51. DOI 10.3390/vetsci2020043.

RODRIGUES, Cleusa Alves Theodoro, BATISTA, Luís Fábio da Silva, FILHO, Roberto Santos Teixeira, SANTOS, Claire da Silva, PINHEIRO, Cristiane Garboggini, ALMEIDA, Taís Fontoura de, FREITAS, Luiz Antônio Rodrigues de et VERAS, Patrícia Sampaio Tavares, 2009. IFN- γ expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation *in vitro*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 février 2009. Vol. 127, n° 3, pp. 382-388. DOI 10.1016/j.vetimm.2008.10.324.

ROLLAND-TURNER, Magali, FARRÉ, Guillaume et BOUÉ, Franck, 2006. Cloning of fox (*Vulpes vulpes*) IL2, IL6, IL10 and IFN γ and analysis of their expression by quantitative RT-PCR in fox PBMC after in vitro stimulation by Concanavalin A. *Veterinary Immunology and*

Immunopathology. 15 avril 2006. Vol. 110, n° 3, pp. 369-375.
DOI 10.1016/j.vetimm.2005.10.006.

SARPONG, Kathryn J., LUKOWSKI, Jennifer M. et KNAPP, Cassandra G., 2017. Evaluation of mortality rate and predictors of outcome in dogs receiving outpatient treatment for parvoviral enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 novembre 2017. Vol. 251, n° 9, pp. 1035-1041. DOI 10.2460/javma.251.9.1035.

SCHMITZ, Silke, HENRICH, Manfred, NEIGER, Reto, WERLING, Dirk et ALLENSPACH, Karin, 2013. Comparison of TNF α responses induced by Toll-like receptor ligands and probiotic *Enterococcus faecium* in whole blood and peripheral blood mononuclear cells of healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 mai 2013. Vol. 153, n° 1, pp. 170-174. DOI 10.1016/j.vetimm.2013.02.014.

SCHWARZ, Megan, TORRE, Denis, LOZANO-OJALVO, Daniel, TAN, Anthony T., TABAGLIO, Tommaso, MZOUGH, Slim, SANCHEZ-TARJUELO, Rodrigo, BERT, Nina Le, LIM, Joey Ming Er, HATEM, Sandra, TUBALLES, Kevin, CAMARA, Carmen, LOPEZ-GRANADOS, Eduardo, PAZ-ARTAL, Estela, CORREA-ROCHA, Rafael, ORTIZ, Alberto, LOPEZ-HOYOS, Marcos, PORTOLES, Jose, CERVERA, Isabel, GONZALEZ-PEREZ, Maria, BODEGA-MAYOR, Irene, CONDE, Patricia, OTEO-IGLESIAS, Jesús, BOROBIA, Alberto M., CARCAS, Antonio J., FRÍAS, Jesús, BELDA-INIESTA, Cristóbal, HO, Jessica S. Y., NUNEZ, Kemuel, HEKMATY, Saboor, MOHAMMED, Kevin, MARSIGLIA, William M., CARREÑO, Juan Manuel, DAR, Arvin C., BERIN, Cecilia, NICOLETTI, Giuseppe, NOCE, Isabella Della, COLOMBO, Lorenzo, LAPUCCI, Cristina, SANTORO, Graziano, FERRARI, Maurizio, NIE, Kai, PATEL, Manishkumar, BARCESSAT, Vanessa, GNJATIC, Sacha, HARRIS, Jocelyn, SEBRA, Robert, MERAD, Miriam, KRAMMER, Florian, KIM-SCHULZE, Seunghee, MARAZZI, Ivan, BERTOLETTI, Antonio, OCHANDO, Jordi et GUCCIONE, Ernesto, 2022. Rapid, scalable assessment of SARS-CoV-2 cellular immunity by whole-blood PCR. *Nature biotechnology*. novembre 2022. Vol. 40, n° 11, pp. 1680. DOI 10.1038/s41587-022-01347-6.

SHACKELTON, Laura A., PARRISH, Colin R., TRUYEN, Uwe, HOLMES, Edward C. et BERNS, Kenneth I., 2005. High Rate of Viral Evolution Associated with the Emergence of Carnivore Parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. Vol. 102, n° 2, pp. 379-384.

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G. et BANETH, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 28 octobre 2009. Vol. 165, n° 1-2, pp. 1-18. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

SPIBEY, N., GREENWOOD, N.M., SUTTON, D., CHALMERS, W.S.K. et TARPEY, I., 2008. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Veterinary Microbiology*. avril 2008. Vol. 128, n° 1-2, pp. 48-55. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.09.015.

SQUIRES, R. A., CRAWFORD, C., MARCONDES, M. et WHITLEY, N., 2024. 2024 guidelines for the vaccination of dogs and cats – compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). *Journal of Small Animal Practice*. mai 2024. Vol. 65, n° 5, pp. 277-316. DOI 10.1111/jsap.13718.

Thibault, J.C., Bouvet, J., Cupillard, L. & Guigal, P.M. (2016) Evaluation of the impact of residual maternally derived antibodies against canine parvovirus on the efficacy of a standard primary vaccination protocol. Research communications of the 25th ECVIM-CA congress. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **30**, 438.

THIRY, Étienne, 2015. *Virologie clinique du chien et du chat*. 2e éd. Paris : les Éditions du Point vétérinaire. Collection Manuel pratique. ISBN 978-2-86326-353-2. 636.089 691

TSAO, Jun, CHAPMAN, Michael S., AGBANDJE, Mavis, KELLER, Walter, SMITH, Kathy, WU, Hao, LUO, Ming, SMITH, Thomas J., ROSSMANN, Michael G., COMPANS, Richard W. et PARRISH, Colin R., 1991. The Three-Dimensional Structure of Canine Parvovirus and Its Functional Implications. *Science*. 22 mars 1991. Vol. 251, n° 5000, pp. 1456-1464. DOI 10.1126/science.2006420.

VALLI, J. L., WILLIAMSON, A., SHARIF, S., RICE, J. et SHEWEN, P. E., 2010. *In vitro* cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 avril 2010. Vol. 134, n° 3, pp. 218-229. DOI 10.1016/j.vetimm.2009.09.023.

WILSON, Stephen, ILLAMBAS, Joanna, SIEDEK, Elisabeth, STIRLING, Catrina, THOMAS, Anne, PLEVOVÁ, Edita, STURE, Gordon et SALT, Jeremy, 2014. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. *Vaccine*. septembre 2014. Vol. 32, n° 42, pp. 5420-5424. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.07.102.

ZHAO, Jialin, HAN, Xuling, LI, Helian, LUO, Yali, FANG, Yan, WANG, Yun, GAO, Jian, ZHAO, Yiran, HAN, Jingxuan et QIAN, Feng, 2024. Analysis of the Immune Response by Standardized Whole-Blood Stimulation with Metabolism Modulation. *Phenomics*. 1 février 2024. Vol. 4, n° 1, pp. 81-89. DOI 10.1007/s43657-023-00114-0.

Auteur : Thomas Quinard

Mise au point d'une méthode permettant d'évaluer la réponse vaccinale à médiation cellulaire chez le chien

Résumé

Nous avons tenté de mettre au point une méthode permettant d'évaluer la réponse vaccinale à médiation cellulaire chez le chien. Pour cela, nous avons utilisé des animaux de tout âge vaccinés contre le parvovirus canin. Dans un premier temps, l'objectif était de stimuler du sang total. Pour cela nous avons mélangé au sang, des peptides de parvovirus canin à différentes concentrations. Ensuite, afin d'évaluer la réponse immunitaire à médiation cellulaire, nous avons mesuré, par RT-qPCR, la quantité d'ARN du gène CXCL10. Les résultats n'étant pas concluants il a été décidé de réitérer l'expérience en isolant au préalable les PBMC. Aucune différence significative n'a été notée entre le témoin non stimulé et les échantillons stimulés. Nous avons donc conclu que la stimulation de sang total ou de PBMC, chez le chien, ne permet pas d'évaluer la réponse vaccinale à médiation cellulaire probablement en raison d'une absence de cellules immunitaires circulantes dirigées contre l'agent vaccinal.

Mots clés : parvovirus canin, chien, vaccin, immunité à médiation cellulaire, stimulation, sang total, PBMC

Development of a method for assessing cell-mediated vaccine response in dogs

Abstract

We set out to develop a method for assessing the cell-mediated vaccine response in dogs. To this end, we used animals of all ages vaccinated against canine parvovirus. Initially, the aim was to stimulate whole blood. To achieve this, we mixed canine parvovirus peptides at different concentrations with the blood. Then, to assess the cell-mediated immune response, we measured the amount of CXCL10 gene RNA by RT-qPCR. As the results were inconclusive, we decided to repeat the experiment, isolating PBMCs beforehand. No significant difference was observed between the unstimulated control and the stimulated samples. We therefore concluded that stimulation of whole blood or PBMC in dogs does not allow assessment of the cell-mediated vaccine response, probably due to the absence of circulating immune cells directed against the vaccine agent.

Keywords: canine parvovirus, dog, vaccine, cell-mediated immunity, stimulation, whole blood, PBMC