

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine vétérinaire

Titre de la thèse en Français : Epidémiologie de l'infection par l'Herpèsvirus canin :
relation avec les troubles de la reproduction

Titre de la thèse en Anglais : Epidemiology of canine herpesvirus infections –
Relation to reproductive disorders

Candidat: Veerle Ronsse

Promoteur: Prof. John Verstegen

Département et Service: Département des Sciences cliniques, Service d'Obstétrique et Troubles de la Reproduction
des petits Animaux, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 12 Mars 2004

Composition du Jury :

Membres internes à la Faculté de Médecine vétérinaire : M. Balligand, J-F. Beckers, C. Clercx,
A. Clinquart, C. Hanzen, P. Lekeux, K. Onclin, E. Thiry.

Membres externes à la Faculté de Médecine vétérinaire : F. Schynts (Division Virologie, CER-Marloie),
G. England (Breeding and Puppy Walking Centre).

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'herpèsvirose canine (CaHV-1) a été reconnue pour la première fois par Carmichael en 1965 comme un agent susceptible de provoquer une maladie hémorragique fatale chez des chiots nouveau-nés. Des études récentes dans différents pays d'Europe Occidentale suggèrent que la séroprévalence du CaHV-1 dans la population canine est élevée, surtout chez les chiens vivant en colonies. Il existe différents tests pour le sérodiagnostic du CaHV-1, le test de séroneutralisation (SN) et l'ELISA étant utilisés le plus fréquemment. L'ELISA est connu pour sa grande sensibilité, présente l'avantage d'être simple et s'inscrit dans un contexte d'automatisation. Les tests de SN ont, quant à eux, l'avantage d'être très spécifiques. Les transmissions oronasale et vénérienne sont considérées comme les voies de transmission principales du CaHV-1, mais les *foeti* peuvent aussi être infectés *in utero*. De même qu'elle a été décrite chez d'autres alphaherpèsvirus, la latence

dans les ganglions sensoriels a aussi été démontrée pour le CaHV-1. Le virus est faiblement immunogène, induisant des taux d'anticorps neutralisants qui ne persistent élevés que pendant quelques mois après infection. Les facteurs de risque qui déterminent la séroconversion et la réactivation du virus en cas de latence, sont peu documentés. Par ailleurs, l'information sur les modèles d'anticorps longitudinaux et la fréquence d'excrétion virale clinique et subclinique dans des conditions de terrain naturelles, reste anecdotique. Finalement, l'isolation virale et les tests de SN ont souvent été utilisés, alors que les tests plus récents, comme la PCR et l'ELISA, l'ont été beaucoup moins.

L'objectif de la première étude était de déterminer la séroprévalence actuelle du CaHV-1 dans la population canine belge chez les chiens d'élevage et chez les chiens de particuliers. Comme des facteurs altérant l'immunité peuvent influencer la pathogénie des herpèsvirus, nous avons également analysé les séroprévalences chez les chiens de particuliers en fonction du motif de la consultation. Nous

avons aussi évalué la corrélation entre, et la sensibilité et spécificité relative d'un ELISA et 2 tests de SN (un avec et un sans addition de complément), 3 tests étant utilisés en routine dans des laboratoires de diagnostic. Dans une deuxième étude, nous avons examiné quels facteurs de risque influençaient les taux d'anticorps CaHV-1. Nous avons également évalué quelle était l'importance relative de ces facteurs de risque et dans quelle mesure ils étaient corrélés. Finalement nous avons évalué la relation entre les taux d'anticorps CaHV-1 et les troubles de la reproduction.

Dans une troisième étude, le comportement clinique et épidémiologique du CaHV-1 a été étudié dans des conditions de terrain. Pendant un cycle de reproduction, les taux d'anticorps et l'excrétion virale ont été suivis respectivement en ELISA et en PCR. Des différences relatives au stade du cycle, à la taille des élevages et à l'occurrence de saillies et de gestations ont été examinées. Pour évaluer l'importance des porteurs sains, nous avons étudié dans quelle mesure les troubles de la reproduction et l'infertilité étaient associés aux taux d'anticorps et à l'excrétion virale.

RÉSULTATS

Dans la première étude, une séroprévalence globale de 45,75 % a été observée dans la population canine belge quand le seuil de positivité a été fixé à 1. Avec un seuil de positivité fixé à 0,48 (le seuil de détection de l'ELISA), la séroprévalence atteint près de 80 %. Elle a donc fortement augmenté depuis 1980 et est comparable à celle des autres pays d'Europe étudiés récemment. Aucune différence significative en séroprévalence n'a pu être observée basée sur l'origine (élevage ou particuliers), le motif de consultation ou le sexe des chiens. Cette non-signification du sexe et de l'origine pourrait suggérer que la transmission oronasale est épidémiologiquement plus importante que la transmission vénérienne. La corrélation entre l'ELISA et les 2 tests de SN était moyenne. Une très bonne corrélation a cependant pu être observée entre les 2 tests de SN. La sensibilité de l'ELISA est apparue significativement supérieure à celle des 2 tests de SN. L'addition de complément a été caractérisée par des titres SN plus élevés, mais n'a pas augmenté la sensibilité. Ceci confirme que les récents tests de SN sans addition de complément ont une sensibilité équivalente aux tests SN avec addition de complément. La spécificité des tests SN était nettement supérieure à celle de l'ELISA.

La deuxième étude nous a démontré que les taux d'anticorps CaHV-1 sont influencés par plusieurs facteurs individuels et environnementaux. L'effet de l'élevage est apparu comme très important. Cette étude a également démontré que les transmissions oronasale et vénérienne interviennent toutes les 2 dans la propagation du virus au niveau de l'élevage. Une séroconversion progressive avec l'âge, se manifestant principalement entre 6 mois et 2 ans, a été observée chez

la femelle. Chez le mâle, la saillie était déterminante, les échanges entre élevages pour faire des saillies accroissant également les taux d'anticorps. La toux des chenils, l'hygiène et la taille de l'élevage sont apparus comme des facteurs épidémiologiquement importants. Des taux d'anticorps plus élevés ont ainsi été observés chez des mâles et femelles appartenant à des élevages avec un historique de la toux des chenils. Dans les élevages présentant des déficiences en matière d'hygiène, des taux d'anticorps plus élevés ont été observés. Chez les femelles appartenant à des petits élevages (moins de 6 chiens) des taux inférieurs ont été observés comparés aux chiennes de moyens (6 à 20 chiens) et grands (plus de 20 chiens) élevages. Par ailleurs, dans les grands élevages, des taux d'anticorps plus élevés ont été observés en cas de mauvaise hygiène. Pour limiter la circulation du virus, une bonne hygiène est donc nécessaire, et elle est même indispensable dans les grands élevages et les élevages avec un historique de la toux des chenils. En ce qui concerne le stade du cycle, des taux plus bas ont été observés au début du di-œstrus. Toutefois, ni la race, ni le sexe ou le fait de participer à des expositions n'ont influencé les taux d'anticorps. L'association entre l'état sérologique et l'historique des troubles de la reproduction dans les élevages est apparue comme faible. Seule une relation entre un historique d'avortement et l'état sérologique a pu être observée.

Finalement, la troisième étude nous a démontré que dans des élevages où le CaHV-1 est endémique, un pourcentage élevé des chiennes sont séropositives. Dans les grands élevages, des taux d'anticorps élevés ont souvent persisté pendant des mois, des contacts oronasaux affectant vraisemblablement ce résultat. Ni le stade du cycle ni l'occurrence de saillies et de gestations n'ont influencé les taux d'anticorps. Des troubles de la reproduction (résorptions fœtales et momifications) et de l'infertilité ont fréquemment (46 %) été observés. Ces chiennes présentaient souvent des taux d'anticorps plus bas au début ou à la fin du di-œstrus. Cependant des taux d'anticorps élevés n'ont pas systématiquement protégé la portée pendant la gestation. Une image mixte de porteurs sains et cliniques a souvent été observée. La virémie ou l'excrétion nasale et vaginale n'ont pas pu être mises en évidence. Dans les élevages où le virus est endémique et une certaine immunité présente, l'excrétion est par conséquent brève. Cette étude nous suggère également que la sérologie peut être utilisée pour détecter une infection au niveau de l'élevage. Il est par contre conseillé d'échantillonner un maximum d'animaux de l'élevage ou au moins d'échantillonner le même individu à plusieurs reprises avec un intervalle de 15 jours à 1 mois. En ce qui concerne l'utilisation de la PCR pour le diagnostic étiologique du CaHV-1 chez un animal subissant des troubles de la reproduction, un échantillonnage répété, ciblé au moment de l'occurrence des troubles, semble opportun. L'utilisation de la PCR avant la saillie, comme outil de diagnostic préventif, semble toutefois inutile en l'absence

de lésions génitales. Par ailleurs, comme le comportement clinique du CaHV-1 et les taux d'anticorps sont imprévisibles, une approche préventive avec vaccination systématique des femelles reproductrices est recommandée, particulièrement dans les élevages présentant un historique de troubles de la reproduction.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, ces études nous démontrent que :

- la situation épidémiologique du CaHV-1 en Belgique a fortement évolué en 2 décennies. Le virus est actuellement endémique dans une grande partie de la population canine belge ;
- l'ELISA est une technique très sensible pour détecter des anticorps CaHV-1. Dans l'interprétation des résultats sérologiques, il faut cependant tenir compte de sa faible spécificité et inclure de préférence d'autres outils de diagnostic ;
- beaucoup de facteurs individuels et environnementaux influencent les taux d'anticorps CaHV-1 ;
- la transmission oronasale est importante dans la sérologie du CaHV-1, mais une transmission mixte oronasale et vénérienne est observée dans les élevages ;
- les taux d'anticorps et le comportement clinique du CaHV-1 sont imprévisibles. Une approche préventive incluant la vaccination des chiennes reproductrices est donc indiquée ;
- la mise en évidence de l'ADN viral du CaHV-1 reste difficile. En ce qui concerne l'utilisation de la PCR, des analyses répétées sur plusieurs jours au moment de l'occurrence de lésions génitales ou de troubles de la reproduction doivent être réalisées. L'utilisation de la PCR dans un diagnostic de prévention avant la saillie paraît inutile lorsque des lésions génitales sont absentes.

Nos études nous permettent dorénavant de conseiller l'approche de gestion suivante dans les élevages :

- 1) apporter une attention particulière au maintien dans les exploitations et instaurer des normes d'hygiène optimales ;
- 2) utiliser des jeunes chiennes (de 2-5 ans) pour reproduire ;
- 3) isoler les chiennes gestantes et allaitantes et leurs portées du reste de l'élevage ;
- 4) vacciner tous les chiens de l'élevage contre les autres pathogènes reconnus (maladie de Carré, parvovirose, hépatite contagieuse et toux des chenils) ;
- 5) vacciner les chiennes reproductrices dans les élevages CaHV-1 positifs, surtout quand un historique de troubles de la reproduction est présent ;

6) dans les cas d'utilisation d'animaux externes à l'élevage pour faire des saillies, il faudra vérifier l'état sérologique CaHV-1 et l'historique des troubles de la reproduction de l'élevage. Par ailleurs, il faut s'assurer qu'une politique de vaccination correcte et de bonnes conditions d'hygiène sont présentes dans l'élevage ;

7) en cas de lésions génitales et/ou de troubles de la reproduction, il faudra échantillonner les animaux concernés. Cependant une isolation virale ou PCR négative n'excluent pas la possibilité d'une atteinte par le CaHV-1, puisque l'excrétion virale peut être très brève et que le virus est difficile à mettre en évidence. Si des analyses ponctuelles (PCR ou isolation virale, autopsie et sérologie) au moment même des lésions ou troubles ne peuvent pas être réalisées, il est conseillé de doser les anticorps chez différents individus de l'élevage. La sérologie nous informera alors d'une éventuelle infection de l'élevage et nous permettra d'instaurer une approche préventive.

Une gestion de la prévention des signes cliniques et des conditions d'élevage adaptées devraient ainsi nous permettre de mieux combattre le CaHV-1 et de limiter les pertes économiques souvent considérables dans les élevages infectés. Comme des données récentes sur la prévalence du CaHV-1 sur d'autres continents manquent et que les échanges internationaux s'accroissent, il est nécessaire d'étudier l'état d'infection de la population canine sur ces autres continents.

Par ailleurs, puisque dans les élevages infectés, presque la moitié des chiennes suivies ont eu des troubles de la reproduction ou un cycle infertile, l'importance du virus dans ces cas cliniques devrait être réévaluée et l'éventuelle pathogénie clarifiée. Comme des outils de diagnostic clinique pendant le premier tiers de la gestation ne nous permettent pas d'élucider la pathogénie du CaHV-1, il faudra réaliser des prélèvements tissulaires génitaux (ovariens et utérins) et embryonnaires pour étudier la cause d'éventuels défauts d'implantations et la localisation du virus. L'investigation de la pathogénie du CaHV-1 lors de troubles de la reproduction dans des stades plus avancés de la gestation pourrait, complétée par des prélèvements tissulaires utérins et fœtaux, être réalisée par des suivis échographiques des flux vasculaires fœtaux et placentaires (comme l'artère ombilicale) et des mesures biométriques. En effet, puisque le CaHV-1 est associé à des atteintes placentaires, surtout d'origine vasculaire, résultant en des sous-développements placentaires et fœtaux, avec avortements, mais également la naissance de chiots affaiblis, légers, soi-disant « prématurés » (Hashimoto *et al.*, 1979 ; 1983b), l'échographie doppler pourrait être un outil de diagnostic clinique non invasif pour évaluer le degré d'atteinte placentaire et fœtale (nulle, partielle ou totale) par le virus. A ce jour, les études expérimentales sur le CaHV-1 *in utero* n'ont en effet jamais évalué la pathogénie dans

des suivis longitudinaux. Ces données longitudinales nous informeraient également sur le mécanisme de réactivation après latence du CaHV-1. Cependant, pour élucider le mécanisme d'atteinte génitale lors de réactivation, les sites de prédilection de latence (comme le ganglion trijumeau et lombo-sacré) devraient également être étudiés quant à la présence d'ADN viral.

Par ailleurs, pour pouvoir optimiser la gestion des saillies et pour justifier scientifiquement l'approche à avoir envers l'utilisation de l'insémination artificielle, il faudra examiner de quels organes et/ou tissus du tractus urogénitale le virus peut être isolé. Pour le HSV-2, autre herpèsvirus sexuellement transmissible et avec le ganglion lombo-sacré comme site de latence, l'isolation du virus du vas déférens, de l'épididyme, des testicules, de la vésicule séminale et de la prostate a pu être réalisée lors de primo-infections. Cependant, ces isolations étaient rares lors de réactivations (Stephanopoulos *et al.*, 1989). Une rétention urinaire temporaire avec excrétion par l'urine avait également été observée dans cette étude. L'investigation de l'effet protecteur de la vaccination contre l'excrétion virale et de la manifestation de lésions génitales chez les mâles pourrait également être intéressante.

Par ailleurs, à part le fait de pouvoir agir comme pathogène primaire dans des troubles de la reproduction, le CaHV-1 peut également agir en tant que pathogène secondaire dans des troubles respiratoires chez le chien pré-pubère et adulte (Huxsoll et Hemelt, 1970 ; Wright et Cornwell, 1970 ; Kraft et Riggs, 1986). Nos études nous ont clairement démontré que la toux des chenils est un facteur épidémiologiquement important dans la transmission du CaHV-1. Il reste cependant à évaluer dans quelle mesure la transmission oronasale, et notamment les souches CaHV-1 isolées lors de la toux des chenils, provoque des troubles reproductifs *in utero* dans des conditions d'infections naturelles dans les élevages. Même

si nos études démontrent une image mixte d'excrétion oronasale et génitale dans les élevages, des souches avec une pathogénie différente pour le système génital et respiratoire (dans certains élevages séropositifs nous n'avons jamais vu de troubles de la reproduction) pourraient exister. Dans ce cadre, des effets cytopathogènes différents ont été observés (Poste, 1972 ; Carmichael et Medic, 1978) alors que les lésions génitales observées varient également (Appel *et al.*, 1969 ; Poste et King, 1971 ; Hill et Maré, 1974 ; Hashimoto *et al.*, 1983a). Une autre hypothèse est qu'une combinaison de facteurs prédisposants provoqueraient la manifestation de signes cliniques. Nos recherches ont déjà démontré que certains facteurs individuels et environnementaux favorisent la circulation du virus dans l'élevage. Cependant, à part la pathogénie *in utero* du CaHV-1, les facteurs prédisposant à des manifestations cliniques (comme e.g. l'âge) au niveau du tractus génital devront être étudiés et confirmés. Dans ce cadre, bien que la cause principale de l'infertilité reste une mauvaise gestion et un suivi défectueux de la chienne lors des chaleurs, d'autres agents infectieux (comme des bactéries), des troubles hormonaux et/ou de la consanguinité peuvent être à la base de troubles reproductifs. Il se pourrait également que certains de ces facteurs interagissent avec la manifestation clinique du CaHV-1 (comme c'est notamment le cas au niveau du tractus respiratoire lors de toux des chenils), dans des conditions d'élevages où le virus est endémique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le support généreux pour ce travail procuré par Merial, Laboratoires de Lyon Gerland France.

RÉFÉRENCES

- APPEL M.J.G., MENEGUS M., PARSONSON I.M., CARMICHAEL L.E. Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-week-old pups. *Am. J. Vet. Res.*, 1969, **30**, 2067-2073.
- CARMICHAEL L.E., MEDIC L.S. Small-plaque variant of canine herpesvirus with reduced pathogenicity for newborn pups. *Infect. Immun.*, 1978, **20**, 108-114.
- HASHIMOTO A., HIRAI K., OKADA K., FUJIMOTO Y. Pathology of the placenta and new born pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.*, 1979, **40**(9), 1236-1240.
- HASHIMOTO A., HIRAI K., FUKUSHI H., FUJIMOTO Y. The vaginal lesions of a bitch with a history of canine herpesvirus infection. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 1983a, **45**, 123-126.
- HASHIMOTO A., HIRAI K., SUZUKI Y., FUJIMOTO Y. Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *Am. J. Vet. Res.*, 1983b, **44**, 610-614.
- HILL H., MARÉ C.J. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.*, 1974, **35**, 669-673.
- HUXSOLL D.L., HEMELT I.E. Clinical observations of canine herpesvirus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1970, **156**, 1706-1713.

- KRAFT S., RIGGS M. The role of neonatal canine herpesvirus infection in mixed infections in older dogs. *Cont. Ed.*, 1986, **8**, 688-697.
- POSTE G. Characterization of a new canine herpes virus. *Arch. Gesamte Virus Forsch.*, 1972, **36**, 147-157.
- POSTE G., KING N. Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. *Vet. Rec.*, 1971, **88**, 229-233.
- STEPHANOPOULOS D.E., MYERS M.G., BERNSTEIN D.I. Genital infections due to herpes simplex virus type 2 in male guinea pigs. *J. Infect. Dis.*, 1989, **159**, 89-95.
- WRIGHT N.G., CORNWELL H.J.C. Further studies on experimental canine herpesvirus infection in young puppies. *Res. Vet. Sci.*, 1970, **11**, 221-226.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- RON SSE V., VERSTEGEN J., ONCLIN K., GUIOT A.L., AEBERLÉ C., NAUWYNCK H.J., POULET H. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reprod Domest. Anim.*, 2002, **37**, 299-304.
- RON SSE V., POULET H., VERSTEGEN J., THIRY E. L'herpès virose canine. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 65-76.
- RON SSE V., VERSTEGEN J., ONCLIN K., FARNIR F., POULET H. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CaHV-1). *Theriogenology*, 2004, **61**, 619-636.
- RON SSE V., VERSTEGEN J., THIRY E., ONCLIN K., AEBERLÉ C., BRUNET S., POULET H. Canine herpesvirus-1 (CaHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*, 2005, sous presse.