



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 16494

To cite this version :

Mantelli, Morgane. *Mise au point de méthodes mini-invasives d'évaluation du transfert d'immunité et du transfert énergétique chez le chiot de moins de 48 heures*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 96 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

MISE AU POINT DE MÉTHODES MINI-INVASIVES D'ÉVALUATION DU TRANSFERT D'IMMUNITÉ ET DU TRANSFERT ÉNERGÉTIQUE CHEZ LE CHIOT

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

MANTELLI Morgane

Née, le 03 décembre 1991 à Marseille (13)

Directeur de thèse : Mme Sylvie CHASTANT

JURY

PRESIDENT :

Mme Frédérique SAVAGNER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Sylvie CHASTANT
Mme Catherine TRUMEL

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Mme Hanna MILA

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES-MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIostatistiques :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury de thèse,

A Madame le Professeur Frédérique SAVAGNER,
Professeur des Universités,
Praticien hospitalier,
Hormonologie, Endocrinologie moléculaire
Qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse

En témoignage de mon profond respect.

A Madame le Professeur Sylvie CHASTANT,
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE,
Pathologie de la reproduction,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de notre thèse,

Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Cathy TRUMEL,
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie Médicale des Equidés et Carnivore
Qui nous a fait l'honneur de prendre part à notre jury,

Sincère reconnaissance.

A Hannah MILA, pour son aide et sa gentillesse.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	13
<u>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	15
I. Prise colostrale chez le chiot.....	15
1. Mortalité du chiot en élevage : données épidémiologiques.....	15
2. Composition analytique du colostrum.....	16
3. Acquisition de l'immunité chez le chiot.....	17
4. Acquisition d'énergie par le chiot.....	20
II. Estimation de la prise de colostrum.....	21
1. Evaluation du transfert passif d'immunité.....	21
a. Dosage direct des immunoglobulines sériques.....	21
b. Méthodes alternatives d'évaluation du transfert d'immunité.....	24
c. Comparaison des outils de mesure.....	29
2. Evaluation du transfert énergétique.....	30
a. Méthodes invasives de mesure de la glycémie.....	30
b. Alternatives non invasives de mesure de glycémie.....	32
c. Comparaison des outils de mesure.....	35
III. Physiologie rénale du chiot.....	36
1. Maturation de la fonction rénale.....	36
2. Composition analytique de l'urine du chiot.....	37
<u>PARTIE EXPERIMENTALE.....</u>	41
I. Matériel et méthodes.....	41
1. Sélection des animaux.....	41
2. Prélèvements.....	41
3. Paramètres sanguins.....	43
a. Dosage des immunoglobulines sériques.....	43
b. Dosage de la protidémie totale.....	44
c. Dosage de l'activité sérique des PAL et des GGT.....	45
d. La réfractométrie.....	45
e. Mesure de glycémie.....	45
4. Description des méthodes de dosage mises en œuvre sur les urines.....	45
a. Dosage de la glycosurie.....	45
b. Dosage de la protéinurie.....	46
5. Analyse statistique.....	46

II. Résultats.....	48
1. Description de la population.....	48
2. Paramètres relatifs aux chiots.....	49
a. Poids des chiots.....	51
b. Croissance.....	51
c. Paramètres sériques.....	52
d. Paramètres urinaires.....	58
3. Corrélations entre les différents paramètres.....	60
a. Corrélations entre la concentration sérique en IgG et les différents paramètres.....	60
b. Corrélation entre la glycémie à 24 heures et les différents paramètres.....	71
4. Valeur diagnostique des méthodes alternatives.....	75
a. Mesure de la concentration sérique des IgG à 48 heures.....	75
b. Mesure de la glycémie à 24 heures.....	75
 <u>DISCUSSION</u>.....	 77
I. Limites de l'étude.....	77
1. La population.....	77
2. Conditions environnementales.....	77
3. Echantillons.....	78
II. Résultats.....	79
1. Evaluation de la qualité du transfert d'immunité passif.....	79
a. Concentration sérique en IgG.....	79
b. Performance diagnostique des outils de mesure indirecte.....	80
2. Evaluation de la qualité du transfert énergétique.....	81
a. Glycémie.....	81
b. Performance diagnostique des outils de mesure indirects.....	82
III. Perspectives d'optimisation du transfert d'immunité.....	82
 CONCLUSION.....	 85
 BIBLIOGRAPHIE.....	 89

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Etapes conditionnant la qualité du transfert d'immunité passive chez le chiot</i>	18
Figure 2 : <i>Proportion de chiots vivants à 2 jours selon leur concentration sérique en IgG à l'âge de 2 jours (d'après Mila et al., 2014)</i>	18
Figure 3 : <i>Concentrations sériques en Ig chez le chiot en fonction de leur âge lors de l'administration de colostrum (d'après Chastant-Maillard et al., 2012)</i>	19
Figure 4 : <i>Technique d'immunodiffusion radiale sur gel d'agarose (d'après cours Immunologie ENVT, 2^{ème} année, 2013)</i>	22
Figure 5 : <i>Outil de lecture (1) et exemple de plaque IDR de dosage des IgG (2) après diffusion de l'échantillon à tester (d'après IDBiotech, BOV IgG1 Test [®], http://www.idbiotech.com)</i>	22
Figure 6 : <i>Principe du test ELISA (D'après les cours d'immunologie, ENVT, 2^{ème} année, 2013)</i>	23
Figure 7 : <i>Méthode de lecture du test semi-quantitatif BOVI-G (http://www.kitvia.com)</i>	24
Figure 8 : <i>Réfractomètre optique utilisé et échelle de mesure (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japon ; http://www.agir-crt.com)</i>	25
Figure 9 : <i>Protéinurie chez le veau-nouveau-né en fonction du délai après la prise colostrale (d'après Kickhofen et al., 1971)</i>	26
Figure 10 : <i>Activités enzymatiques sériques moyennes des PAL (U/L) et des GGT (U/L) chez les mères. Résultats obtenus dans l'espèce canine (d'après Center et al., 1991)</i>	27
Figure 11 : <i>Activités enzymatiques moyennes des PAL (U/L) et des GGT (U/L) dans le colostrum et le lait des mères après la mise-bas. Résultats obtenus dans l'espèce canine (d'après Center et al., 1991)</i>	28
Figure 12 : <i>Activité sérique moyenne des PAL (U/L) chez les chiots ayant bu le colostrum et chez les chiots n'ayant pas bu de colostrum (d'après Center et al., 1991)</i>	28
Figure 13 : <i>Activité sérique moyenne des GGT (U/L) chez les chiots ayant bu le colostrum et chez les chiots n'ayant pas bu de colostrum (d'après Center et al., 1991)</i>	29
Figure 14 : <i>Système de mesure de glucose en continu Guardian Real-Time[®] (MEDTRONIC MiniMed, Northridge, USA). De gauche à droite : moniteur, transmetteur à distance, capteur électrochimique (Wiedmeyer et DeClue, 2008)</i>	31
Figure 15 : <i>Système Guardian Real-Time[®](MEDTRONIC MiniMed, Northridge, USA) en place (Wiedmeyer et al., 2008)</i>	32
Figure 16 : <i>Moyens de mesure de glycémie non invasifs (D'après Ferrante do Amaral et Wolf, 2008)</i> 33	
Figure 17 : <i>Appareil de mesure non invasive de la glycémie : GlucoWatch[®] (GlucoWatch Cygnus Inc., USA, Potts et al., 2002)</i>	34
Figure 18 : <i>Evolution du débit de filtration glomérulaire en fonction de l'âge du chiot (D'après Horster et Valtin, 1971)</i>	37
Figure 19 : <i>Evolution quantitative de la protéinurie chez le chiot sain en fonction de l'âge (D'après Lane et al., 2000)</i>	38
Figure 20 : <i>Evolution de la densité urinaire en fonction de l'âge du chiot (d'après Horster et Valtin, 1971)</i>	38
Figure 21 : <i>Réalisation de la pesée</i>	42
Figure 22 : <i>Prélèvement auriculaire de sang et mesure de glycémie</i>	42
Figure 23 : <i>Prélèvement d'urines et mesure de la densité urinaire par réfractométrie</i>	42
Figure 24 : <i>Chronologie des prélèvements réalisés au cours de l'étude</i>	43

Figure 25 : Représentation des corrélations testées entre la concentration sérique en IgG (g/L) à 48 heures et les différents paramètres.....	47
Figure 26 : Représentation des corrélations testées entre la glycémie (mg/dL) à 24 heures et les différents paramètres.....	47
Figure 27 : Poids des chiots (g) en fonction des formats raciaux à 12 heures, 24 heures et 48 heures	51
Figure 28 : Taux de croissance entre 12 heures et 48 heures d'âge.....	52
Figure 29 : Concentrations sériques en IgG (g/L) à J2 (n=62).....	53
Figure 30 : Prévalence du déficit du transfert de l'immunité passive en fonction du format racial	53
Figure 31 : Valeurs de la densité optique sérique à J2 (n=62).....	54
Figure 32 : Evolution de la glycémie (mg/dL) de l'effectif total (n=62), des races de petit format racial (n=20) et de grand format racial (n=42).....	55
Figure 33 : Prévalence de l'hypoglycémie (glycémie inférieure à 32mg/dL) en fonction du format racial.....	55
Figure 34 : Protidémie (g/L) mesurée à J2 (n=62)	56
Figure 35 : Activité enzymatique sérique (U/L) des PAL à J2 (n=62)	57
Figure 36 : Activité enzymatique sérique (U/L) des GGT à J2.....	57
Figure 37 : Activité enzymatique sérique des PAL et des GGT (U/L) en fonction des formats raciaux à J2.....	57
Figure 38 : Evolution de la densité urinaire de l'effectif total (n=62), chez les chiots de petite race (n=20) et chez les chiots de grande race (n=42).....	58
Figure 39 : Protéinurie (mg/L) à J2 (n=62).....	59
Figure 40 : Glycosurie (mmol/L) à J1 mesurées (n=62).....	59
Figure 41 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le poids (g) à 12 heures (n=62)	61
Figure 42 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité urinaire à 12 heures (n=62).....	61
Figure 43 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à 12 heures (n=62).....	61
Figure 44 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le poids (g) à 24 heures (n=62)	62
Figure 45 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité urinaire à 24 heures (n=62).....	63
Figure 46 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à 24 heures (n=62).....	63
Figure 47 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à 24 heures (n=62).....	63
Figure 48 : Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité urinaire à J1	64
Figure 49 : Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à J1.....	64
Figure 50 : Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycosurie (mmol/L) à J1.....	65
Figure 51 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le poids (g) à 48 heures (n=62)	66

Figure 52 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à 48 heures (n=62).....	67
Figure 53 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la protidémie (g/L) à 48 heures (n=62).....	67
Figure 54 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité optique à 48 heures (n=62).....	67
Figure 55 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le taux de croissance (%) entre 12 et 48 heures (n=62)	68
Figure 56 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des PAL (U/L) à 48 heures (n=62).....	68
Figure 57 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des GGT (U/L) à 48 heures (n=62).....	68
Figure 58 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité urinaire à 48 heures (n=62).....	69
Figure 59 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la protéinurie (mg/L) à 48 heures (n=62).....	69
Figure 60 : Corrélation significative ($p<0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le taux de croissance (%) entre 12 heures et 48 heures.	69
Figure 61 : Corrélation significative ($p<0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des PAL (U/L) à 48 heures d'âge	70
Figure 62 : Corrélation significative ($p<0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des GGT (U/L) à 48 heures d'âge	70
Figure 63 : Corrélation significative ($p<0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des PAL (U/L) à 48 heures d'âge	71
Figure 64 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et le poids (g) à J1 (n=62).....	72
Figure 65 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et la densité urinaire à 24 heures (n=62)	72
Figure 66 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et la glycosurie (mmol/L) à 24 heures (n=62) .	72
Figure 67 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et le poids (g) à 48 heures (n=62)	73
Figure 68 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et la densité urinaire à 48 heures (n=62)	73
Figure 69 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et la croissance entre 12 et 48 heures (n=62) .	74
Figure 70 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et le taux de croissance (%) entre 12 et 48 heures (n=62).....	74
Figure 71 : Corrélation significative ($p<0,05$) entre la glycémie (mg/dL) à J1 et le taux de croissance (%) entre 12 heures et 48 heures.....	74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Incidence de la mortalité en fonction de l'âge des chiots (d'après Belin 2013)	15
Tableau 2 : Composition comparée du colostrum 24 heures après la mise-bas et du lait (D'après Center et al., 1991 ; Adkins et al., 2001)	17
Tableau 3 : Evolution physiologique de la glycémie en fonction de l'âge du chiot (D'après Moon et al., 2001).....	20
Tableau 4 : Comparaison des coefficients de corrélation entre la concentration sérique en GGT et la concentration en IgG (g/L) mesurée par la méthode de référence	28
Tableau 5 : Activités sériques moyennes en PAL et en GGT (U/L) chez des chiots cliniquement sains âgés de 1 à 3 jours comparativement à celles de chiens adultes cliniquement sains (D'après Center et al., 1991).....	29
Tableau 6 : Comparaison des coefficients de corrélation entre la concentration en IgG mesurée par la méthode de référence (IDR) et les méthodes alternatives ainsi que les sensibilité et spécificité de détection des concentrations en IgG inférieures à 10 g/L par des méthodes alternatives.	30
Tableau 7 : Comparaison des méthodes de mesure de glycémie, en comparaison avec une mesure de glycémie effectuée sur sang jugulaire.	35
Tableau 8 : Répartition des chiots inclus dans l'étude en fonction de leur format racial	48
Tableau 9 : Valeurs moyennes des paramètres testés à 12, 24 et 48 heures à l'échelle de la population.	49
Tableau 10 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et les paramètres testés à 12 heures (n=62).....	60
Tableau 11 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et les paramètres testés à 24 heures (n=62).....	62
Tableau 12 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et les paramètres testés à 48 heures (n=62).....	66
Tableau 13 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et les paramètres testés à 24 heures (n=62)	71
Tableau 14 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et les paramètres testés à 48 heures (n=62)	73
Tableau 15 : Sensibilité (%) et spécificité (%) des outils indirects de détection d'un défaut de transfert passif d'immunité (seuil de décision pour une concentration sérique en IgG inférieure à 2,3g/L)	75
Tableau 16 : Sensibilité (%) et spécificité (%) des outils indirects de détection d'un défaut de transfert énergétique (seuil de décision pour une glycémie inférieure à 92mg/dL).....	76
Tableau 17 : Performance diagnostique des outils de mesure indirecte du transfert d'immunité passif chez le veau (Données bibliographiques)	81

LISTE DES ABBREVIATIONS

D.O : Densité optique sérique (g/L)

D.U : Densité urinaire

GGT : Gammaglutamyl-transférases

IgG : Immunoglobulines G

PAL : Phosphatases alcalines

Introduction

Chez les espèces à placentation épithéliochoriale ou endothéliochoriale telles que les canidés, les bovins, les équidés ou les porcins, l'ingestion du premier lait maternel dans les quelques heures suivant la mise-bas est essentielle à la survie du nouveau-né. En effet, chez le chiot, à la différence de l'espèce humaine, le transfert d'immunité sous forme d'anticorps passe à 90% par l'ingestion précoce de colostrum.

Ce dernier apporte non seulement les immunoglobulines essentielles pour le système immunitaire du nouveau-né mais également des facteurs énergétiques nécessaires à sa croissance. Une prise insuffisante de colostrum engendre donc d'une part une mortalité liée à des états d'hypoglycémie et d'hypothermie (Le Dividich *et al.*, 2005), et d'autre part, des taux de morbidité et de mortalité néonatale et pédiatrique élevés. Effectivement, une déficience dans le transfert d'immunité augmente la sensibilité du jeune aux pathologies infectieuses (McGuire *et al.*, 1976 ; Donovan *et al.*, 1998). La précocité de l'ingestion de colostrum est essentielle puisque la perméabilité intestinale autorisant l'absorption des gammaglobulines (IgG) est limitée aux 12 premières heures suivant la mise-bas chez le chiot (Chastant-Maillard *et al.*, 2012).

L'immunité et l'énergie fournies au chiot par le colostrum sont indispensables à sa survie. A l'âge de deux jours on estime que 30% des chiots présentent un déficit énergétique et que 20% des chiots présentent un déficit d'immunité acquise (Mila *et al.*, 2014 ; 2015). L'intérêt de connaître la qualité des transferts d'immunité et d'énergie, reflétant la bonne prise colostrale, quelques heures à quelques jours après la mise bas prend donc ici tout son sens.

Chez les animaux de rente, des tests réalisables au chevet de l'animal sont disponibles, et permettent une estimation rapide du transfert d'immunité. L'objectif premier de ces tests est de repérer les individus à risque accru de mortalité assurant ainsi une prise en charge précoce de l'individu débilité. Aucun test de ce type n'étant disponible dans l'espèce canine, l'évaluation du statut immunitaire du chiot passe nécessairement par un dosage des immunoglobulines sériques par méthode ELISA, non réalisable au chevet de l'animal et relativement complexe à mettre en œuvre. Quant à l'évaluation du transfert énergétique, elle peut se faire par mesure de la glycémie. Dans les deux cas, un prélèvement sanguin sur un jeune chiot est indispensable ce qui pose à la fois des problèmes techniques et de bien-être animal. Les raisons que nous venons d'évoquer mettent en avant la difficulté à la fois pour l'éleveur et le vétérinaire à repérer les chiots présentant un déficit immunitaire et/ou énergétique retardant donc la mise en place de mesures de soutien.

Le but de ce travail était donc d'identifier des méthodes mini-invasives de détermination des statuts immunitaire et énergétique du chiot, idéalement réalisables par l'éleveur dans sa pratique quotidienne.

Nous avons suivi 62 chiots issus du même élevage, de races et de portées différentes, de leur naissance jusqu'à deux jours *post-partum*. Plusieurs paramètres ont été suivis (poids, paramètres sanguins et urinaires) dont le résultat a été comparé à la technique de référence pour l'évaluation du statut immunologique (dosage sérique des IgG par test ELISA à deux jours d'âge).

Dans une première partie, à travers une synthèse bibliographique, nous discuterons des principales causes de mortalité néonatale et pédiatrique chez le chiot. Les conditions ainsi

que l'importance du transfert passif d'immunité et de l'apport d'énergie de la mère à ses nouveau-nés seront ensuite abordées. Nous verrons ensuite les différentes méthodes disponibles pour évaluer la bonne prise colostrale sans se limiter à l'espèce canine avant de considérer les approches mini-invasives envisageables. La seconde partie de ce manuscrit sera consacrée à la présentation de nos résultats expérimentaux.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Prise colostrale chez le chiot

1. Mortalité du chiot en élevage : données épidémiologiques

Les premières semaines de vie du chiot sont découpées en plusieurs périodes. La période néonatale se situe entre la naissance et trois semaines de vie. Elle est elle-même divisée en deux parties avec une période néonatale dite précoce dans la première semaine de vie, puis une période tardive du 8^{ème} au 21^{ème} jour (Tonnessen *et al*, 2012). La période pédiatrique précoce concerne quant à elle les chiots de 21 jours jusqu'à la fin du sevrage (soit environ 56 jours).

Le taux de mortalité néonatale et pédiatrique en élevage canin est élevé, notamment comparativement aux taux enregistrés en élevage d'animaux de rente, et reste assez peu documentée. La littérature rapporte, en effet, un taux de mortalité de la naissance au sevrage variant entre 9% et 23% (Tableau 1).

Les pertes économiques consécutives sont importantes, ce qui explique l'intérêt d'une meilleure gestion du chiot nouveau-né ainsi qu'une détection précoce des animaux à risque.

Tableau 1 : Incidence de la mortalité en fonction de l'âge des chiots (d'après Belin 2013)

	Mortinatalité (% par rapport à la mortalité totale)	Mortalité (% par rapport à la mortalité totale)			Mortalité totale (% par rapport aux chiots nés totaux)
		Mortalité néonatale		Mortalité pédiatrique (J21-J56)	
		Précoce (J0-J7)	Tardive (J8-J21)		
Potkay et Bacher (1977)	36,1%	48,9%	15%		23,5%
Nielen <i>et al</i> (1998)	43,6%	34,8%	12,3%	9,3%	21,7%
Van der Breek <i>et al</i> (1999)	25,4%	74,6%			21,7%
Gill (2001)	43,5%	55,9%	9,1%		20,2%
Indrebo <i>et al</i> (2007)	61,4%	28,7%	6,1%	3,8%	17,7%
Tonnessen <i>et Al</i> (2012)	48,0%	51%	11%		9%
Belin (2013)	43,7%	43,7%	38,9%	17,4%	22,8%

C'est durant la première semaine de vie que la mortalité est la plus importante puisqu'elle représente à elle seule environ 90% de la mortalité néonatale. La détection des chiots à risque et la mise en place de mesures de soutien doivent donc être précoces et ce d'autant plus que les symptômes précédant la mort d'un chiot nouveau-né sont souvent frustrés et peu spécifiques avec des réponses aux traitements souvent décevantes.

La première cause de mortalité néonatale est infectieuse (Nielen *et al.*, 1998 ; Van der Beek *et al.*, 1999) avec *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, et l'herpès virus canin de type 1 comme agents infectieux le plus souvent isolés (Münnich, 2008).

Les affections néonatales touchent deux grandes classes d'individus, à savoir les chiots présentant des signes de détresse en *peri-partum* plus ou moins immédiats et les chiots nés

en apparence bonne santé avant de se dégrader de façon brutale. Ce deuxième groupe de chiots présente un syndrome de dépérissement ou « Puppy fadding syndrom ». Cette entité pathologique est définie de façon essentiellement clinique avec un faisceau de symptômes regroupant une hypothermie, une hypoglycémie, une déshydratation et une hypotension pouvant être accompagnée par des signes d'hypoxie. Les causes de ce syndrome de dépérissement peuvent être classées en quatre groupes que sont les causes environnementales, consécutives à la mise-bas et à la mère, génétiques et infectieuses. Ce sont ici les causes infectieuses et les causes d'origine maternelle que l'on va chercher à objectiver en vue de contrôler la mortalité.

La maîtrise de la prise colostrale se trouve être un élément déterminant dans le contrôle de la mortalité néonatale. L'immunité du chiot nouveau-né est en effet permise par le transfert d'immunoglobulines (Ig) maternelles via la consommation du colostrum dans les heures suivant sa naissance, à une période où l'intestin est suffisamment perméable pour autoriser le passage de macromolécules vers la circulation sanguine. Bien qu'une prise insuffisante de colostrum engendre dans un premier temps une mortalité liée à des états hypoglycémiques ou hypothermiques (Le Dividich *et al.* 2005), plusieurs études ont également mis en évidence l'influence notable de la qualité du transfert passif de l'immunité sur la morbidité et la mortalité périnatales : plus la concentration en IgG circulantes chez le nouveau-né est faible, plus celui-ci est à risque de développer des pathologies infectieuses telles que diarrhée ou pneumonie avant le sevrage (Mc Guire *et al.* 1976, Donovan *et al.* 1998).

La qualité du transfert passif c'est-à-dire de la quantité d'Ig plasmatiques circulante chez le nouveau-né, dépend de la quantité de colostrum consommé, de sa concentration en Ig et de leur absorption intestinale.

L'acquisition de l'immunité du chiot et la qualité du transfert énergétique permises par la consommation du colostrum sont expliquées plus en détails ci-dessous.

2. Composition analytique du colostrum

Afin de déterminer les paramètres pouvant être mesurés chez le chiot en vue d'évaluer la prise colostrale, il convient de rappeler brièvement la composition du colostrum, différente de celle du lait.

Le colostrum apporte des nutriments, de l'eau, des facteurs de croissance, des enzymes digestives, des vitamines, des minéraux et des immunoglobulines maternelles. La valeur énergétique du colostrum est élevée mais variable selon les auteurs. On trouve en effet des valeurs comprises entre 640 kcal/L et 1800 kcal/L (Adkins *et al.*, 2001 ; Moon *et al.*, 2001). Certains composants du colostrum, comme les immunoglobulines, les phosphatases alcaline (PAL) ou encore les γ -glutamyltransférases (GGT) sont quasiment absents dans le lait (Tableau 2). Il convient de souligner les concentrations colostrales élevées en GGT et en PAL. La concentration sérique en GGT et en PAL dans le colostrum canin est 10 fois supérieure pour les PAL et 1000 supérieure pour les GGT aux concentrations sériques (Center *et al.*, 1991).

Tableau 2 : Composition comparée du colostrum 24 heures après la mise-bas et du lait (d'après Center et al., 1991 ; Adkins et al., 2001)

* Données sous la forme Moyenne±SEM (SEM représentant l'erreur type)

	Colostrum	Lait
Protéines (g/L)*	143 ±19,2	75
Dont IgG à 24 heures <i>post-partum</i> (g/L)*	26,5 ±6,8	Négligeable
Lactose (g/L)	16,6	30-58
Lipides (g/L)	132,2	25-130
Concentration en PAL (U/L)	1000	Négligeable
Concentration en GGT (U/L)	5500	Négligeable
Energie brute (kcal/L)	1831	1460

3. Acquisition de l'immunité chez le chiot

Comme nous avons commencé à l'évoquer précédemment, à la naissance, le système immunitaire du chiot est compétent mais naïf. On estime à seulement 4 à 6% la part des IgG circulantes du chiot à l'âge de deux jours qui sont transmises par voie transplacentaire (Day, 2011).

A la naissance, la concentration sérique en IgG du chiot est de l'ordre de 0,3 mg/mL pour atteindre 20 mg/mL 48h après l'ingestion du colostrum (Chastant-Maillard *et al.*, 2012). Ainsi, la majorité de l'immunité maternelle sera transmise au fœtus grâce à l'ingestion du colostrum par le jeune dans les premières heures suivant le part. Une prise de colostrum correcte permet d'assurer la couverture immunitaire du chiot *via* les IgG maternelles avant que ne débute la synthèse d'IgG endogènes.

A la naissance, le chiot est donc particulièrement vulnérable à tout agent pathogène présent dans l'environnement puisqu'il lui faudra au minimum deux semaines avant que la réponse immunitaire qu'il met en place ne soit efficace pour répondre à une agression.

Le taux d'anticorps absorbés par le chiot dépend de la qualité du colostrum, de la quantité absorbée par le chiot ainsi que du délai entre la naissance et l'ingestion (Figure 1). En dessous d'une concentration sérique de 2,3g/L d'IgG à 48 heures de vie, les chiots ont un risque de mortalité accru, et que dans la population étudié, 17,6% des chiots étaient en dessous de ce seuil (Figure 2). Cette concentration seuil est indicative de mortalité avec une sensibilité de 66,7% et une spécificité de 87,8% (Mila *et al.*, 2014).

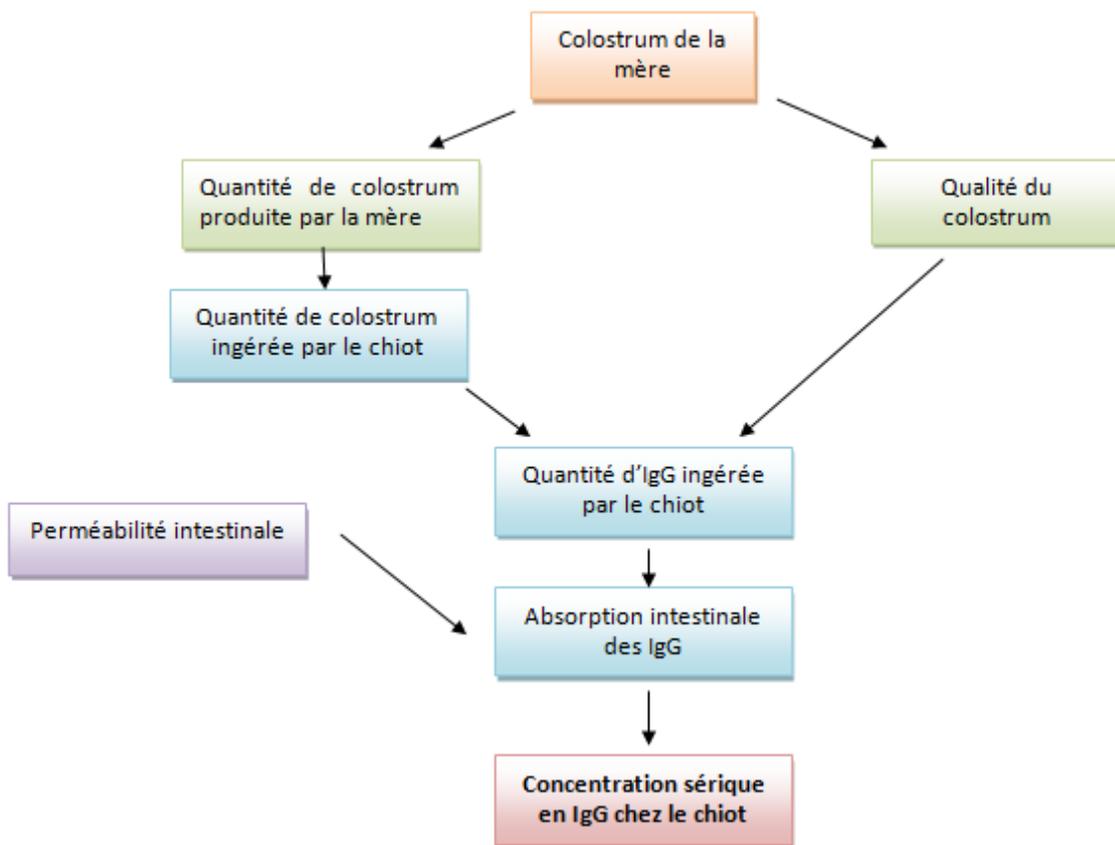


Figure 1 : Etapes conditionnant la qualité du transfert d'immunité passive chez le chiot

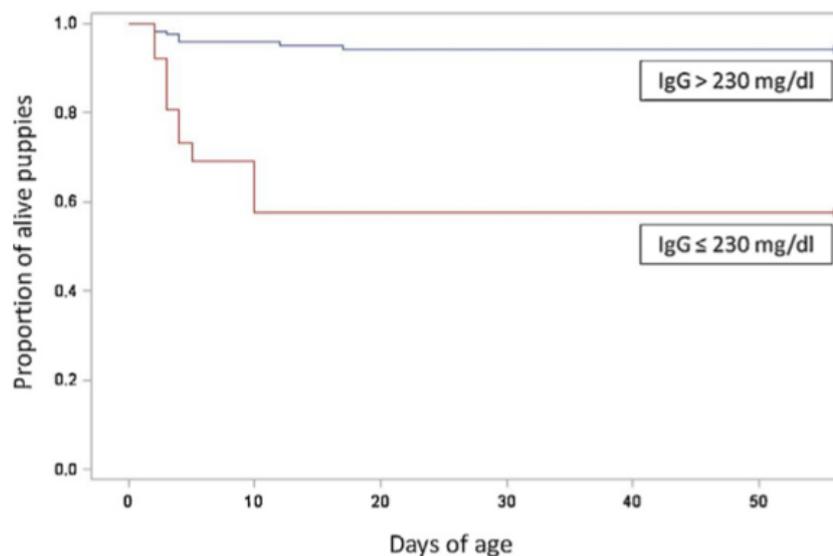


Figure 2 : Proportion de chiots vivants à 2 jours selon leur concentration sérique en IgG à l'âge de 2 jours (d'après Mila et al., 2014)

La précocité de l'ingestion du colostrum revêt une importance cruciale dans la qualité de l'immunité transmise via le colostrum. Des études récentes montrent que les immunoglobulines ne peuvent traverser la barrière intestinale après 24 heures chez les chiots, c'est pourquoi l'ingestion de colostrum doit être précoce. A la naissance, le chiot absorbe en moyenne 39% des IgG colostrales qu'il ingère contre 20% 4h après la mise-bas, et 8,7% 12h après la mise-bas (Figure 3). A partir de 24h après la mise-bas, l'absorption est nulle (Chastant-Maillard *et al*, 2012).

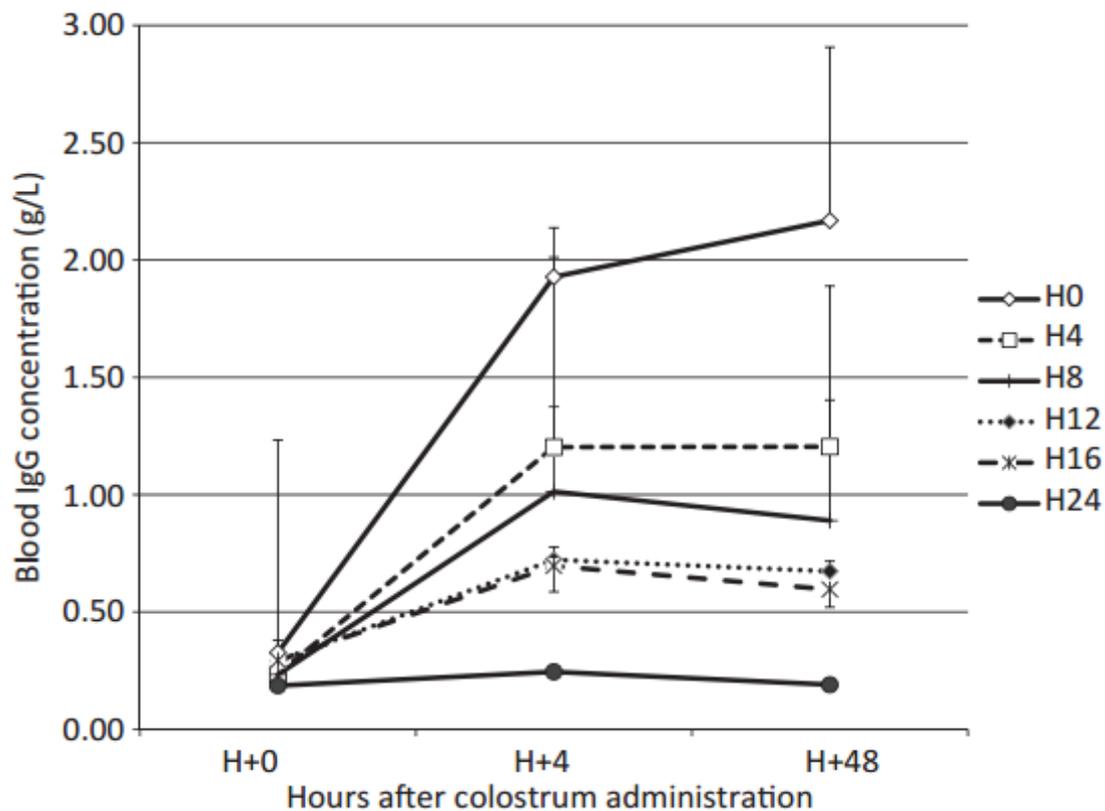


Figure 3 : Concentrations sériques en Ig chez le chiot en fonction de leur âge lors de l'administration de colostrum (d'après Chastant-Maillard *et al.*, 2012)

D'autre part, la concentration du colostrum en IgG diminue rapidement dans les quelques heures suivant la mise-bas. On estime une diminution moyenne de 60% ($\pm 18,0\%$) au cours des 24 premières heures suivant le part. Cette diminution est plus marquée chez les petites races que chez les grandes, respectivement 73,9% et 49,8% (Albaret *et al.*, 2016).

La prise d'une quantité suffisante de colostrum est la dernière condition indispensable à l'acquisition d'un système immunitaire compétent. Dans l'espèce bovine, il est recommandé une consommation de 10% du poids vif du veau au cours du premier repas ou de deux litres de colostrum d'excellente qualité à la naissance puis 12 heures après (Godden *et al.*, 2009). Chez le poulain, la consommation optimale de colostrum est estimée à deux litres (Pagan *et al.*, 2005). Les besoins nutritionnels du chiot sont élevés par rapport à ceux du chien adulte. Le besoin énergétique du chiot la première semaine de vie est estimé à 250 kcal/kg ce qui représente 10 à 15% du poids vif (Norcross, 1982). Ces apports sont à fractionner au cours de la journée. Les chiots prennent en moyenne un repas toutes les deux à trois heures pendant les deux premières semaines de vie, soit 8 à 10 (Voldoire, 2002).

4. Acquisition d'énergie par le chiot

Plusieurs moyens sont disponibles pour estimer l'apport énergétique du chiot : l'évaluation de la croissance, la mesure de la température corporelle et de la glycémie que nous détaillerons plus particulièrement dans cette partie.

En effet, un des moyens les plus simples et sûrs de déterminer si un chiot est en bonne santé est la mesure de son poids et plus exactement la surveillance de sa croissance. Dans les premiers jours de vie, il est estimé qu'un chiot sain, mâle ou femelle, doit prendre 8% de son poids de naissance par jour durant les 3 premiers jours puis 12% par jour les 4 jours suivants (Indrebø *et al.*, 2007). Le chiot doit atteindre le double de son poids de naissance autour de 10-12 jours (Moon *et al.*, 2001). De même, la température est un facteur essentiel pour l'évaluation de l'état de santé d'un animal avec un risque d'hypothermie particulièrement accru chez le nouveau-né du fait d'un rapport surface/volume élevé et de l'absence de nombreux réflexes dont celui du frisson. Les chiots ayant des températures rectales inférieures à 33°C entre un et deux jours de vie présentent un gain moyen quotidien inférieur à la moyenne voire négatif. Une croissance moindre est rapportée chez les chiots ayant présenté une période d'hypothermie. De plus, la digestion du lait ne se fait plus en dessous de 34,4°C (Catteau, 2014).

La glycémie est un des moyens d'évaluer le statut énergétique du chiot. Les valeurs usuelles de la glycémie chez le chiot sont cependant inférieures à celles observées chez l'adulte. En effet, des valeurs moyennes de 88mg/dL (52-127) et de 129mg/dL (111-146) sont respectivement décrites chez les chiots en première et deuxième semaine *post-partum* (Moon *et al.*, 2011). Chez un chiot sain, la glycémie reste constante autour de 88mg/dL au cours des trois premières semaines après la mise bas avant d'augmenter de façon significative vers l'âge de deux mois avec des valeurs similaires à celles retrouvées chez l'adulte (Tableau 3).

Tableau 3 : Evolution physiologique de la glycémie en fonction de l'âge du chiot (d'après Moon *et al.*, 2001).

Les éléments entre parenthèses indiquent les limites inférieure et supérieure de référence.

Age du chiot	1 à 3 jours	2 semaines	4 semaines	8 semaines	Adulte
Glycémie (mg/dL)	88 (52-127)	129 (111-146)	109 (86-115)	145 (134-272)	65-110

Dans la suite de manuscrit, nous considérerons les conséquences d'une hypoglycémie primaire.

L'hypoglycémie peut être primaire c'est-à-dire due à un défaut d'alimentation ou secondaire, c'est-à-dire consécutive, à une autre atteinte de type prématurité, affection respiratoire ou bactérienne.

La sensibilité du chiot à l'hypoglycémie est accrue en *post-partum* immédiat. La glyco-génolyse ne commence qu'après les deux premières heures qui suivent la naissance du fait de la très faible activité de l'enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase responsable de la transformation du glycogène en glucose (Zicker *et al.*, 2008). Au cours des premières 24h *post-partum*, les stocks hépatiques en glycogène diminuent de plus de 50%. A ceci est associé le passage d'un métabolisme uniquement basé sur la glyco-génolyse à un

métabolisme mixte faisant intervenir glycolyse et néoglucogenèse (Kliegman et al 1981 ; 1987).

On estime que 23h de jeûne suffisent à rendre hypoglycémique un chiot sain. De plus, les chiots nouveaux nés ne présentent que peu de tissu adipeux, qui représente seulement 1,3% de l'organisme. Comparativement, l'organisme d'un adulte mâle et d'un adulte femelle contiennent respectivement 12,7% et 19,9% de graisses (Besson *et al.*, 2005). Ainsi, la faible disponibilité en glycogène et en tissu adipeux associé à une activité hépatique faible prédisposent les chiots à l'hypoglycémie. L'ingestion de colostrum, la seule source énergétique disponible pour le chiot nouveau-né (Mila *et al.*, 2015a), puis des tétées fréquentes sont donc indispensables au maintien de la glycémie.

D'autre part, la glycémie se trouve être associée de façon significative au risque de mortalité pendant les 21 premiers jours. On rapporte ainsi une glycémie moyenne à 24h de 88mg/dL (56-128) chez les chiots morts au cours des trois premières semaines *post-partum*, reflétant une prise colostrale insuffisante sur cette période. Comparativement, une glycémie moyenne de 120mg/dL (96-149) est décrite chez les chiots vivants. Une valeur seuil de glycémie à 24 heures permettant de repérer un chiot à risque accru de mortalité a été déterminée à 92mg/dL avec une spécificité de 76,4% et une sensibilité de 65,0% (Mila *et al.*, 2015a).

La forte fréquence du déficit de transfert d'immunité (20%) aussi bien que d'apport énergétique (30%) ainsi que le lien entre ces deux déficits et l'augmentation du risque de mortalité mettent en évidence la nécessité d'un diagnostic précoce d'un défaut de prise colostrale.

II. Estimation de la prise de colostrum

1. Evaluation du transfert passif d'immunité

a. Dosage direct des immunoglobulines sériques

Les méthodes directes d'estimation de la qualité de la prise colostrale impliquent un dosage quantitatif des IgG sériques chez le nouveau-né. Ces techniques incluent la technique d'immuno-diffusion radiale (IDR) de Mancini, la technique ELISA ainsi que d'autres méthodes plus anciennes. Ces techniques sont basées sur le principe de la réaction anticorps-antigène. Dans l'espèce bovine, des tests rapides à mettre en place au chevet du veau sont disponibles.

- Immunodiffusion radiale

L'immunodiffusion radiale (IDR) en gélose (dite de Mancini) repose sur la formation de complexes anticorps-antigènes. Cette technique permet d'affiner le dosage et de quantifier séparément chaque classe d'Ig. Ce dosage quantitatif permet de déterminer la concentration en protéines ou en antigènes dans un échantillon en mesurant le diamètre de l'anneau de précipitation formé par les complexes anticorps-antigène (Figure 4). Il s'agit de la méthode de référence de dosage des IgG dans l'espèce bovine (Levieux, 2007).

Un échantillon de sérum du nouveau-né à tester est placé dans un gel d'agarose contenant les anticorps dirigés contre l'élément à doser (ici, des anticorps anti-IgG). Au fur et à mesure que les IgG du colostrum diffusent dans le gel, les anticorps anti-IgG se lient aux IgG et forment un anneau de précipitation, dont le diamètre est proportionnel à la quantité initiale d'IgG. Une courbe étalon permet alors de lire le résultat de manière précise (Figures 4 et 5). Chez le veau de 48 heures, il faudra suspecter un défaut de transfert d'immunité colostrale pour des concentrations en IgG, IgM et IgA respectivement inférieures à 10g/L, 0,8g/L et 0,22g/L Cette technique est très précise, peu onéreuse (à 2 € HT par analyse) mais longue (18 à 24h), ce qui rend son utilisation difficile au chevet de l'animal (Devery-Pocius *et al*, 1979, 1983).

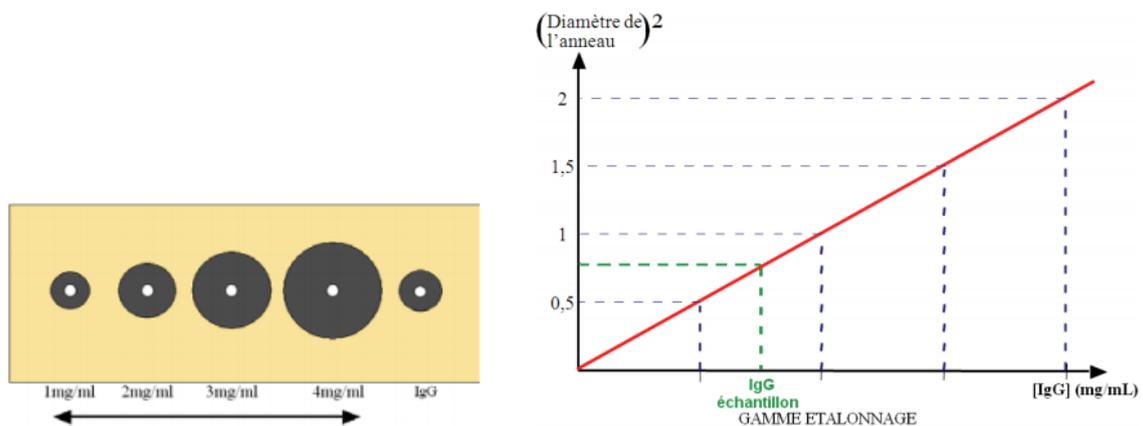


Figure 4 : Technique d'immunodiffusion radiale sur gel d'agarose (d'après cours Immunologie ENVT, 2^{ème} année, 2013)

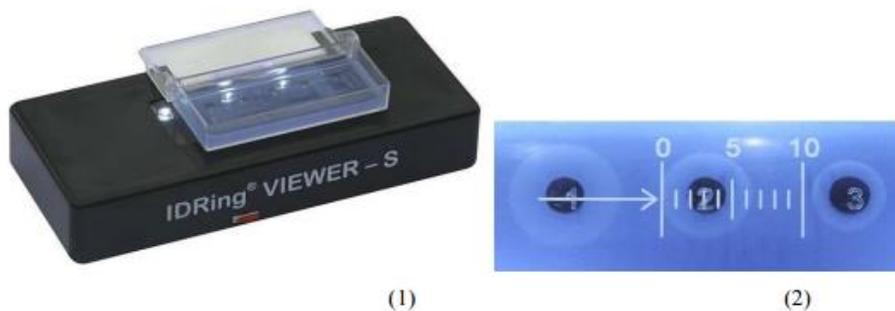


Figure 5 : Outil de lecture (1) et exemple de plaque IDR de dosage des IgG (2) après diffusion de l'échantillon à tester (d'après IDBiotech, BOV IgG1 Test ®, <http://www.idbiotech.com>).

- Test ELISA

Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) permet le dosage quantitatif des immunoglobulines sériques, et en particulier des immunoglobulines G. Ce test est également basé sur le principe de la réaction antigène-anticorps.

La méthode la plus utilisée est la méthode dite « ELISA sandwich » (Figure 6). Le sérum à doser est dilué dans une solution saline. Une petite quantité est prélevée et déposée sur une plaque de microtitration, au fond de puits contenant des anticorps dirigés spécifiquement contre les immunoglobulines à tester. A ces complexes sont rajoutés des anticorps marqués

par une enzyme et dirigés contre les immunoglobulines à tester. Après lavage, on ajoute un substrat chromogène de l'enzyme. L'absorbance des échantillons est évaluée dans un spectrophotomètre lecteur de plaques de sorte que l'intensité de la coloration obtenue par l'interaction du conjugué enzymatique avec son substrat chromogène soit directement proportionnelle à la concentration en immunoglobulines de l'échantillon à tester. Une gamme étalon est ensuite réalisée, en reportant les concentrations des solutions standards d'immunoglobulines en fonction de leur absorbance. On détermine alors la concentration en immunoglobulines recherchée dans l'échantillon de colostrum testé.

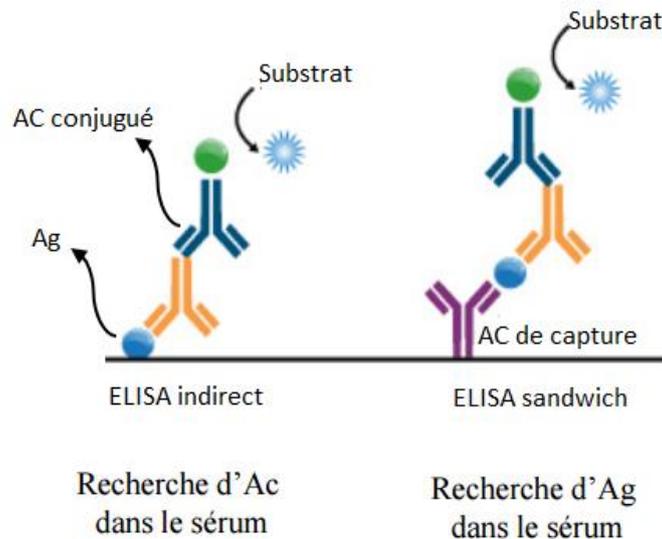


Figure 6 : Principe du test ELISA (D'après les cours d'immunologie, ENVT, 2^{ème} année, 2013)
AC : Anti-Corps ; Ag : Antigène

- Tests de précipitation et de coagulation

D'autres méthodes, plus anciennes et plus rapides à mettre en œuvre, sont basées sur la capacité de certains sels (sulfate de zinc ou sulfate de sodium) à précipiter les immunoglobulines et fournissent une évaluation semi-quantitative de leur concentration sérique. La lecture du test se fait en évaluant le degré de précipitation, visuellement ou au moyen d'un spectrophotomètre ; plus la turbidité est importante, plus l'échantillon testé est riche en immunoglobulines (Ravary *et al*, 2006). Inversement, l'absence ou la diminution de la quantité de précipité formé indique un défaut de transfert passif des immunoglobulines (sensibilité=0,94 ; spécificité=0,83). Le test est ininterprétable en cas d'hémolyse (Weaver *et al*, 2000).

Le test de coagulation au glutaraldéhyde est également une méthode semi-quantitative. Le sérum à tester est mis en contact avec une solution de glutaraldéhyde. Lorsque la concentration en immunoglobulines de l'échantillon est supérieure à 6 g/L, il se forme un caillot ferme, opaque, de couleur jaune. Lors de réaction incomplète, seul un gel semi-solide apparaît au sommet du tube, ce qui reflète une concentration sérique en Ig de 4 à 6 g/L. Toute absence de coagulation traduit une concentration en immunoglobulines inférieure à 4g/L. Un kit commercial existe, le Gammacheck B® (PLASVACC, Templeton, Etats-Unis). Son manque de sensibilité en limite toutefois l'emploi (Sensibilité = 0 à 0,41 ; Spécificité = 0,85 à 1).

Chez les bovins, il existe également des kits immuno-enzymatiques, utilisables avec un prélèvement de sang total réalisé sur anticoagulant et donnant un résultat semi-quantitatif (> 10 g/L ou < 10 g/L). Ce type de test a de nombreux avantages incluant une réalisation au chevet de l'animal, l'obtention d'un résultat rapide (10 à 20 minutes), un faible coût tout en ayant une sensibilité et une spécificité correctes (Maillard, 2006). Le test BOVI-G (KITVIA, Labarthe-Inard, France) offre, à titre d'exemple, une sensibilité de 97,7% et une spécificité de 92,4%. Très pratique, peu onéreux (4,50 euros), fiable et facile d'utilisation (Figure 7), il reste toutefois spécifique de l'espèce bovine ce qui rend son utilisation impossible chez le chien.

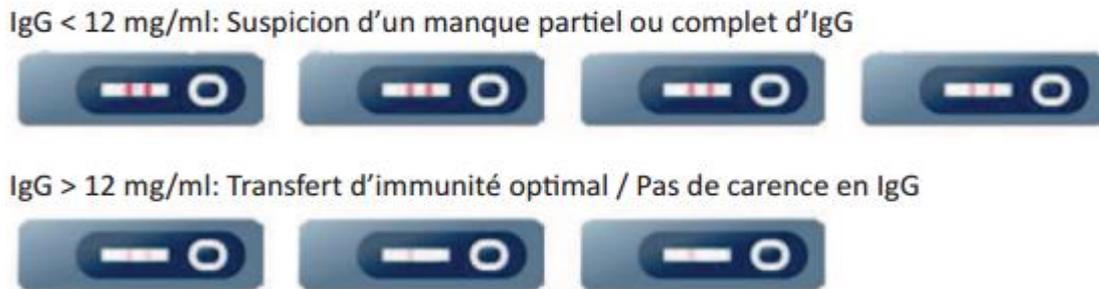


Figure 7 : Méthode de lecture du test semi-quantitatif BOVI-G (<http://www.kitvia.com>)

b. Méthodes alternatives d'évaluation du transfert d'immunité

Plusieurs méthodes ont été proposées pour évaluer la qualité du transfert de l'immunité passive chez les ruminants (Weaver *et al.* 2000).

- Mesure de la protidémie totale

Les protéines totales sériques du veau peuvent permettre d'évaluer indirectement la concentration sérique en IgG. Ce dosage peut être effectué directement avec un analyseur biochimique disponible dans la plupart des cliniques vétérinaires. La mesure est le plus souvent réalisée grâce à la réaction de biuret par émission d'un signal d'intensité lumineuse proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques se créant entre le cuivre et les peptides. Ce signal est ensuite mesuré par spectrophotométrie. Les protéines totales du sérum sont constituées majoritairement d'albumine et de globuline avec un taux d'albumine globalement constant ce qui donne une estimation indirecte de la globulinémie sanguine.

Les concentrations de globulines et d'IgG étant très bien corrélées entre elles chez le veau ($r=0,956$ d'après Husband et Lascelles, 1975), l'évaluation du transfert de l'immunité passive par les IgG peut être réalisée indirectement par la mesure du taux de protéines sériques des veaux. Calloway *et al.* (2002) comparent donnent un coefficient de corrélation de 0,60 entre le taux de protéines totales et la concentration sérique en IgG donnée par IDR, méthode de référence. En termes de performance, une sensibilité de 93,0% et une spécificité de 80,0% sont rapportés pour une concentration seuil d'IgG inférieure à 10g/L (Calloway *et al.* 2002).

Si elle est disponible, une méthode de choix reste l'électrophorèse des protéines plasmatiques, à partir d'un prélèvement sur tube EDTA. L'électrophorèse repose sur le principe de séparation des protéines, comme les immunoglobulines, selon leurs poids

moléculaire en les chargeant négativement par la présence d'agents réducteurs. Les protéines migrent vers le pôle positif d'autant plus vite qu'elles sont de faible poids moléculaire. Par la suite, il est possible de transférer les molécules sur une membrane de nitrocellulose pour procéder à la détection des différentes immunoglobulines grâce à des anticorps spécifiques anti-Ig. De plus, cette méthode présente l'avantage de permettre le dosage des différentes fractions d'Ig. Cependant, l'utilisation sur le terrain est limitée par un coût relativement élevé (7,50 à 13,50 euros par échantillon), par la compétence technique nécessaire mais aussi par les délais de réalisation technique et de réception des résultats (Maillard, 2000).

- Réfractométrie

La réfractométrie optique permet aussi d'estimer indirectement le transfert d'immunité passive par le dosage des protéines totales selon un principe similaire à celui décrit ci-dessus.

La réfractométrie est une technique simple d'utilisation, applicable sur sérum et urines. L'instrument utilisé est un réfractomètre (qui peut être optique ou digital). Sur le terrain, le réfractomètre portable est le plus fréquemment rencontré, initialement utilisé pour mesurer la concentration en sucres dans les fluides de vin, de jus de fruits et de miel et utilisant l'échelle de Brix, exprimée en % (Figure 8). Il fonctionne avec la lumière naturelle et offre une lecture directe.



Figure 8 : Réfractomètre optique utilisé et échelle de mesure (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japon ; <http://www.agir-crt.com>)

Le réfractomètre est calibré de telle sorte qu'il affiche « 0% » pour l'eau distillée. Inversement, l'urine et le sérum contiennent des substances qui absorbent différentes longueurs d'onde lumineuses. Les mesures des indices de réfraction de l'urine et du sérum sont modifiées par la concentration urinaire de toutes les substances dissoutes. De plus, la température affecte la densité de l'urine. Les réfractomètres sont donc calibrés à une température de référence bien que certains appareils disposent d'un adaptateur intégré pour des températures allant de 15 à 37°C. Biemann *et al.* (2010) précisent que la mesure de l'indice de réfractométrie en « % Brix » n'est pas différente selon que la température du prélèvement soit de 5°C, 20°C ou 38°C. Le principe est de déposer une goutte d'échantillon à analyser sur le prisme ; le couvercle est alors refermé et l'instrument est dirigé vers la lumière. Il suffit alors de faire une lecture directe au niveau de l'interligne séparant la zone

claire de la zone sombre. Le fonctionnement du réfractomètre numérique est similaire à celui du réfractomètre optique mais le résultat sur l'échelle Brix est fourni numériquement, avec moins d'erreurs possibles lors de la lecture des résultats sur l'échelle de graduations. Plusieurs études menées chez les bovins ont évalué la corrélation entre la concentration en protéines totales et la concentration en IgG déterminée par IDR. Naylor et Kronefeld (1977) montrent que le réfractomètre optique prédit de manière fiable la concentration en immunoglobulines à partir du dosage des protéines sériques ($r=0,88$) des veaux de race laitière. Une corrélation comparable ($r=0,87$) entre la concentration en IgG sérique et la mesure du taux de protéines au réfractomètre optique a été retrouvée chez des veaux de races allaitantes. La détection d'une concentration sérique en IgG inférieure à 10g/L se fait avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 100% (Perino *et al.* 1993).

- Dosage quantitatif et composition qualitative des protéines urinaires

En termes de quantification de la protéinurie, la méthode de référence est la mesure de l'excrétion protéique à partir d'une collecte d'urines sur 24 heures. Pour des raisons pratiques, elle est peu utilisée en médecine vétérinaire où l'on préfère l'utilisation du rapport protéines sur créatinine urinaire (RPCU) sur un spécimen d'urines. Il n'existe pas de technique de référence pour le dosage des protéines urinaires (Le Bricon *et al.*, 1998). Les méthodes les plus utilisées en laboratoire sont les dosages colorimétriques dont le principe est le suivant : après liaison des protéines avec le colorant, le spectre d'absorption de ce dernier est modifié et la différence d'absorption entre les deux spectres est proportionnelle à la concentration en protéines. Plusieurs chromogènes ont été utilisés ; actuellement on utilise le rouge de pyrogallol et le bleu de Coomassie (Le Bricon *et al.*, 1998). Les deux grandes catégories de protéines que l'on peut retrouver dans les urines sont l'albumine et les globulines. Les deux colorants pré-cités détectent toutefois généralement plus l'albumine que les globulines avec une sensibilité diminuée de 30% en utilisant le rouge de pyrogallol (Gyure, 1977).

Dans l'espèce bovine, le veau nouveau-né développe une protéinurie atteignant un maximum de $1\ 100 \pm 37$ mg/100 mL 25 à 30 heures après la prise colostrale (Kickhofen *et al.*, 1971 ; Figure 9).

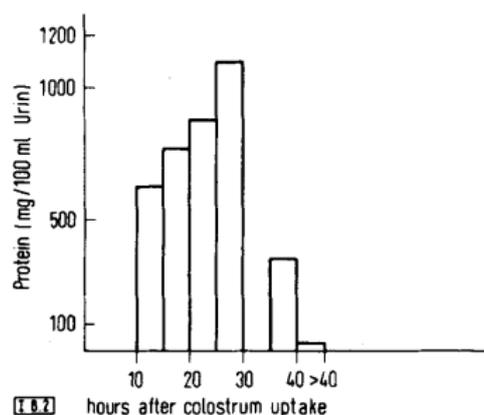


Figure 9 : Protéinurie chez le veau-nouveau-né en fonction du délai après la prise colostrale (d'après Kickhofen *et al.*, 1971).

Outre la quantification globale, il est aussi possible de déterminer de la nature des protéines urinaires par migration électrophorétique. Cette méthode repose sur la différenciation des protéines selon leur poids moléculaire avec sept fractions protéiques différentes :

l'albumine, et les globulines alpha1, alpha2, bêta3, bêta4, bêta5, gamma. Kickhofen *et al.* (1971) montrent ainsi la présence de fraction constante et variable spécifique des IgG, constituants majoritaires du colostrum.

- Dosage des IgG mucosales

German *et al.* (1998) s'intéressent à la pertinence de la mise en œuvre de test ELISA dans le dosage des immunoglobulines sécrétées dans la salive et les larmes chez le chiot de moins de 12 mois d'âge. Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre les concentrations en IgG sérique et mucosale, exception faite des IgM ($r=0,553$; $p=0,004$). Une importante variabilité circadienne est rapportée pouvant expliquer ce manque de corrélation. Schafer-Somi *et al.* (2006) obtiennent des résultats similaires en dosant les immunoglobulines dans les sécrétions nasales de chiots de race Rottweiler suivis de leur naissance jusqu'à 6 semaines d'âge. Là encore, aucune corrélation significative n'est en évidence entre la concentration sérique en IgG et la concentration en IgG des sécrétions nasales.

- Dosage de l'activité sérique des PAL et GGT

Une méthode indirecte consiste à doser l'activité des PAL et des GGT. Ces enzymes sont présentes à de fortes concentrations dans le colostrum. Les GGT sont absorbées en même temps que les immunoglobulines par un mécanisme d'absorption non sélectif (Center *et al.* 1991 ; Weaver *et al.* 2000).

L'activité de ces enzymes est normale dans le sérum des mères (Figure 10). Dans le colostrum, les activités des PAL et des GGT sont supérieures à celles du sérum de la mère, d'un facteur 10 et 1000 pour les PAL et les GGT (Figure 11). A 30 jours *post-partum*, les activités des PAL et des GGT dans le lait sont inférieures à leurs activités sériques (Center *et al.*, 1991).

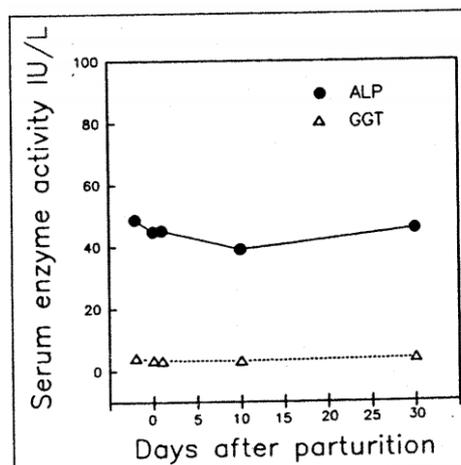


Figure 10 : Activités enzymatiques sériques moyennes des PAL (U/L) et des GGT (U/L) chez les mères. Résultats obtenus dans l'espèce canine (d'après Center *et al.*, 1991)

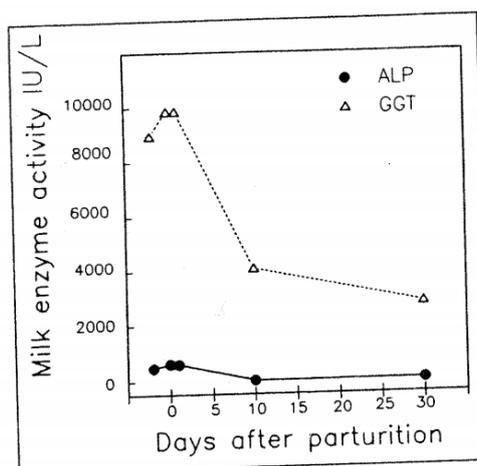


Figure 11 : Activités enzymatiques moyennes des PAL (U/L) et des GGT (U/L) dans le colostrum et le lait des mères après la mise-bas. Résultats obtenus dans l'espèce canine (d'après Center et al., 1991)

Dans l'espèce bovine, la concentration en GGT dans le sérum du veau est corrélée à la quantité de colostrum ingérée. L'intensité de corrélation reste toutefois moyenne (Tableau 4). Ainsi, chez le veau, l'activité sérique de la GGT augmente très rapidement après l'ingestion du colostrum et reste maximale pendant les deux premiers jours de vie. Cette activité est, en outre, beaucoup plus élevée que chez un bovin adulte (Braun et al., 1982).

Tableau 4 : Comparaison des coefficients de corrélation entre la concentration sérique en GGT et la concentration en IgG (g/L) mesurée par la méthode de référence

Auteurs	Age des veaux (jours)	Coefficient de corrélation « r »
Braun et al., 1992	0 à 4	0,62
Perino et Sutherland, 1993	1	0,64
Parish et al., 1997	3 à 10	0,63
Vandeputte et al., 2011	3 à 8	0,49

Chez le chiot, les activités sériques des PAL et des GGT sont significativement supérieures ($p < 0,001$) chez les chiots de 1 jour d'âge ayant bu du colostrum comparativement aux chiots qui n'en ont pas bu (Figures 12 et 13 ; d'après Center et al., 1991).

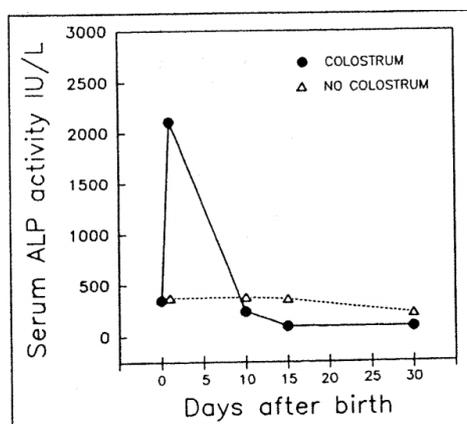


Figure 12 : Activité sérique moyenne des PAL (U/L) chez les chiots ayant bu le colostrum et chez les chiots n'ayant pas bu de colostrum (d'après Center et al., 1991)

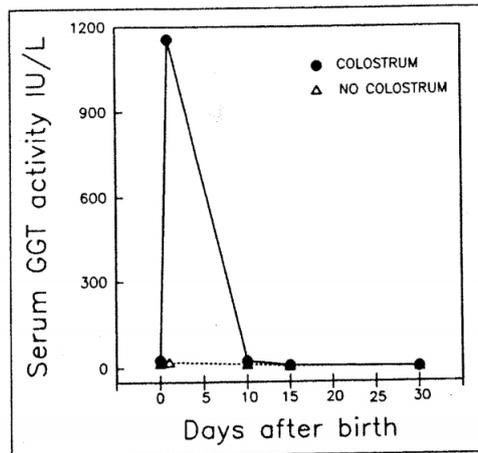


Figure 13 : *Activité sérique moyenne des GGT (U/L) chez les chiots ayant bu le colostrum et chez les chiots n'ayant pas bu de colostrum (d'après Center et al., 1991)*

Ainsi, chez le chiot âgé de 1 jour, les activités enzymatiques en GGT et en PAL sont respectivement 29 fois et 5 fois supérieures à celles mesurées chez le chiot de 2 mois (Center et al., 1991). L'activité enzymatique moyenne des PAL chez le chiot âgé de 1 jour est de 3 845 U/L (618-8 760), celle des GGT est de 1 111 U/L (163-3 558). Ces valeurs sont largement supérieures à celles retrouvées chez l'adulte, et ce jusqu'à 30 jours d'âge (Tableau 5 ; d'après Center et al., 1991).

Tableau 5 : *Activités sériques moyennes en PAL et en GGT (U/L) chez des chiots cliniquement sains âgés de 1 à 3 jours comparativement à celles de chiens adultes cliniquement sains. (d'après Center et al., 1991)*

Les valeurs entre parenthèse représentent les valeurs minimales et maximales.

Enzyme	Chiot âgé de 1 à 3 jours	Chien adulte
PAL (U/L)	3 845 (618-8760)	4 – 107
GGT (U/L)	1 111 (163 – 3 558)	0 – 10

c. Comparaison des outils de mesure

Le tableau 6 montre que le dosage des protéines totales, la réfractométrie sérique et urinaire ainsi que le dosage de l'activité sérique des PAL et des GGT sont des méthodes alternatives d'évaluation du statut immunitaire. Ce sont donc trois procédés que nous allons considérer et évaluer chez le chiot dans la suite de ce manuscrit.

Tableau 6 : Comparaison des coefficients de corrélation entre la concentration en IgG mesurée par la méthode de référence (IDR) et les méthodes alternatives ainsi que les sensibilité et spécificité de détection des concentrations en IgG inférieures à 10 g/L par des méthodes alternatives. Valeurs données pour l'espèce bovine.

	Sensibilité	Spécificité	Coefficient de corrélation
Dosage des protéines totales	93% Calloway et Tyler (2002)	80% Calloway et al., (2002)	r=0,59 Calloway et Tyler (2002)
Réfractométrie optique	80% Perino et Sutherland (1993)	100% Perino et Sutherland (1993)	-r=0,87 Naylor et Kronefeld (1977) -r=0,87 Perino et Sutherland (1993)
Dosage de la protéinurie	r<0,40 German et al. (1998)		
Dosage des Ig mucosales			
Dosage des Ig biliaries			
Dosage de l'activité des PAL et GGT	89,8% Romdhane et al., (1997)	100% Romdhane et al., (1997)	r=0,63 Paris et al., (1992)

2. Evaluation du transfert énergétique

a. Méthodes invasives de mesure de la glycémie

- Mesure après prélèvement sanguin

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la glycémie est un paramètre permettant d'évaluer la prise énergétique du chiot nouveau-né ainsi que son état de santé. Quelque soit la méthode employée, la mesure de glycémie doit être faite au plus tard dans les deux heures suivant le prélèvement en raison de la consommation de glucose par les cellules sanguines. Le cas échéant, un prélèvement sur fluorure de sodium peut être utilisé et permet une conservation du prélèvement pendant 8 heures avant analyse. Il est conseillé d'éviter l'utilisation de tubes héparinés en raison de l'activité glycolytique des plaquettes (Burrin et Price, 1985).

La mesure de glycémie peut se faire en laboratoire spécialisé via des analyseurs biochimiques. Cependant, la nécessité de prélever un volume sanguin important et le temps d'analyse rendent cette technique impossible à mettre en œuvre pour l'éleveur. Les glucomètres portables constituent une alternative en demandant un volume de sang réduit et en offrant une mesure rapide et réalisable par l'éleveur. Cette dernière technique n'implique pas la réalisation d'une prise de sang mais une simple ponction, rendant cet outil moins invasif, et permettant des mesures plus régulières. Un suivi rapproché de la glycémie du chiot est donc envisageable.

Johnson *et al* (2009) mettent en évidence que les valeurs de glycémie données par les glucomètres portables ne correspondent pas exactement avec celles obtenues par un analyseur biochimique. Plus précisément, la glycémie obtenue sur du sang périphérique (oreilles ou coussinets) serait surestimée de 20 à 25% (soit 20 to 70 mg/dL) comparativement à celle mesurée sur du sang jugulaire. Néanmoins, étant donné l'absence de répercussions cliniques induites par ces biais de mesure, il s'avère que l'utilisation de

glucomètres portables reste tout à fait fiable. Un coefficient de corrélation « r » de 0,941 entre la mesure de glycémie obtenue par glucomètre portable et par analyseur biochimique est rapporté par Domori *et al.* (2014).

Ainsi, que ce soit en médecine vétérinaire ou humaine, la méthode de mesure de la glycémie la plus couramment employée est celle du prélèvement transcutané de quelques microlitres de sang, le résultat étant donné en quelques secondes par un glucomètre. Toutefois, le suivi de la glycémie suppose des prélèvements réguliers accentuant l'aspect invasif de la méthode.

- Pose d'un implant sous-cutané

Le suivi continu de la glycémie est envisageable par la pose d'un implant sous-cutané (Figures 14 et 15) permettant d'évaluer la concentration en glucose dans les fluides interstitiels plus que dans le plasma. L'implant, placé dans le tissu sous-cutané abdominal, est relié à un système informatique qui stocke l'ensemble des valeurs mesurées. Le capteur convertit une concentration de glucose en un signal électrique, lui-même transformé en une estimation de la glycémie grâce à une étape de calibrage. Afin d'obtenir un enregistrement optimal, au moins quatre mesures de glycémie capillaire par jour sont nécessaires pour calibrer le système (Choleau et Reach, 2003).

La corrélation entre la concentration en glucose dans le plasma et le sang est excellente puisqu'elle est estimée à 0,997 chez le chien adulte (Surman et Fleeman, 2013). Chez l'Homme, les variations rapides de glycémie entraînent des modifications de la concentration en glucose des fluides interstitiels avec un délai de 5 à 12 minutes et une différence inférieure à 6% (Rebrin *et al.*, 2000). La pose de ce type d'implant permet la réalisation de mesures de glycémie pour des valeurs comprises entre 40 et 400mg/dL toutes les cinq minutes sur plusieurs jours successifs (Wiedmeyer et DeClue., 2008).

Le seul effet indésirable décrit chez l'animal est un saignement mineur observé lors de la pose de l'implant, stoppé par simple compression. Reineke *et al.* (2010) ont suivi des chiens et chats implantés pendant 3 à 8 jours avec des contrôles locaux du site d'implantation réalisés toutes les 8 à 12 heures. Aucun système n'a dû être retiré à cause de signes de douleur, irritation, saignements ou infection.



Figure 14 : Système de mesure de glucose en continu Guardian Real-Time® (MEDTRONIC MiniMed, Northridge, USA). De gauche à droite : moniteur, transmetteur à distance, capteur électrochimique (Wiedmeyer et DeClue, 2008).



Figure 15 : Système Guardian Real-Time® (MEDTRONIC MiniMed, Northridge, USA) en place (Wiedmeyer et al., 2008).

La détection précoce de l'hypoglycémie est un défi en pédiatrie canine. La taille des patients et leur volume sanguin limitent souvent considérablement les prélèvements sanguins. La réalisation de mesures répétées *via* la pose d'un capteur sous-cutané, de petite taille et bien toléré, est donc intéressante.

En médecine humaine, ce système est utilisé chez les patients diabétiques, fournissant un suivi rapproché des variations de glycémie, ce qui est impossible avec les mesures traditionnelles de mesures ponctuelles de glycémie. Le système est implanté sur 3 jours et fournit des valeurs de glycémie avec un intervalle de 5 minutes. Une excellente corrélation ($r=0,92$) est rapportée entre la mesure donnée par le capteur et la glycémie sanguine, avec une erreur moyenne de 19% (Choleau et Reach, 2003).

b. Alternatives non invasives de mesure de glycémie

Une méthode de mesure de glycémie non invasive doit être capable de détecter un faible signal de glycémie au travers des tissus tels que la peau, le tissu adipeux ou encore osseux. D'autre part, le glucose doit être distingué des autres constituants sanguins dont les concentrations sont plus élevées, tels que les acides aminés, l'urée ou l'hémoglobine doit être faite. De telles mesures sont permises par la mise en évidence directe de la structure moléculaire du glucose ou indirecte de modifications de certains paramètres sanguins comme la température ou le pH (Arnold et Small, 2005).

Des mesures de glycémie ponctuelles peuvent être réalisées sur des fluides biologiques comme la salive, l'urine, la sueur ou les larmes. La mesure de la glycémie en continu ne peut se faire que sur des tissus tels que les muqueuses, la peau, la cornée, la langue ou encore la membrane tympanique (Ferrante do Amaral et Wolf, 2008 ; Figure 16).

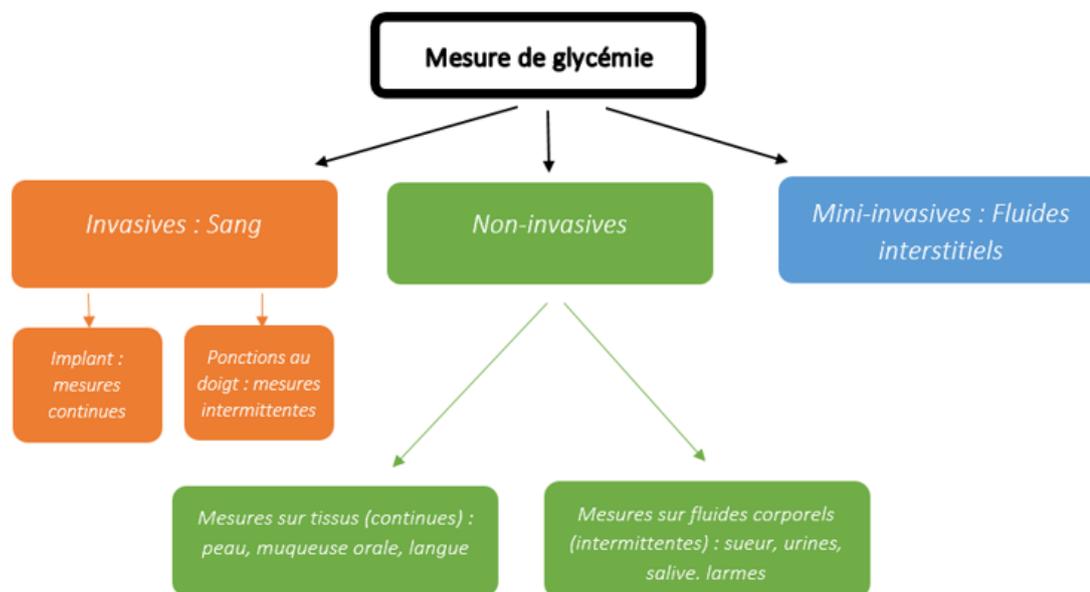


Figure 16 : Moyens de mesure de glycémie non invasifs (D'après Ferrante do Amaral et Wolf, 2008)

Chez le nouveau-né, l'évaluation du statut glycémique se doit d'être rapide, précise et, idéalement, ne nécessiter un échantillon de faible volume. Dans la recherche d'une méthode utilisable en routine par les éleveurs canins, la facilité de mise en œuvre et le coût sont deux éléments qu'il convient aussi de prendre en compte (Deshpande *et al.*, 2005).

Nous présenterons dans la suite de ce manuscrit des méthodes de mesure non invasives ponctuelles ou continues, essentiellement décrites chez l'homme.

- Ionophorèse inversée

L'ionophorèse consiste en l'application d'un faible courant électrique entre une anode et une cathode à la surface de la peau. Les molécules neutres telles que le glucose présentes dans les fluides interstitiels sont ainsi transportées avec les ions au travers de la peau. La glycémie est ensuite mesurée par un capteur conventionnel. Alors que cette approche a principalement été utilisée pour l'administration des médicaments par voie transdermique, l'ionophorèse inversée, permettant l'extraction de substances à la surface de la peau, a été développée en vue du dosage de certains paramètres sanguins.

L'étude de Rebrin *et al.* (2000), menée chez le Beagle, donne un coefficient de corrélation de 0,94 entre la mesure de glycémie donnée par le capteur et celle mesurée sur sang jugulaire. Des valeurs de glycémie comprises en 50-200 mmol/dL peuvent ainsi être évaluées. Le taux d'erreur faible, inférieur à 5%, en fait un outil mini-invasif fiable. Chez l'Homme, une montre portée au poignet (GlucoWatch, Cygnus Inc., USA) est utilisée depuis mars 2001 et permet une mesure de glycémie toutes les 10 minutes pendant les 13 heures d'autonomie de l'appareil (Potts *et al.*, 2002 ; Figure 17).

Les valeurs basses de glycémie (inférieures à 0,7 g/L) sont toutefois surestimées tandis que les valeurs hautes (supérieures à 1,7g/L) sont sous-estimées (Rebrin *et al.*, 2000).

Le principal inconvénient décrit chez l'Homme concerne essentiellement une irritation cutanée modérée (Potts *et al.*, 2002).



Figure 17 : Appareil de mesure non invasive de la glycémie : GlucoWatch® (GlucoWatch Cygnus Inc., USA, Potts et al., 2002).

- Spectroscopie

Les techniques spectroscopiques sont utilisées pour déterminer la présence ou la concentration d'une substance par la mesure de la façon dont elle interagit avec une onde électromagnétique.

La première méthode, de mesure directe, est basée sur les propriétés de la molécule de glucose à absorber des longueurs d'onde comprises entre 590 and 935 nm au niveau cutané, dégageant une énergie thermique. L'infrarouge moyen pénètre dans la peau à une profondeur de 10 à 50 micromètres. Le fluide interstitiel qui y est présent contient du glucose, capable d'absorber la lumière laser émise. L'absorption lumineuse, mesurée par effet photo-acoustique, liée linéairement à la glycémie (Klonoff, 1997). L'énergie mesurée est donc convertie en concentration de glucose. Chez l'Homme, une erreur moyenne inférieure à 1,5mmol/L et un coefficient de corrélation de 0,73 en font un outil envisageable de mesure non invasive de la glycémie. Cette technique se heurte toutefois à l'hétérogénéité de l'absorption cutanée de la lumière, accrue par de nombreux facteurs de variation interindividuels (pigmentation et couleur de la peau, température cutanée, humidité, transpiration) (Yeh *et al.*, 2003). En médecine humaine, la membrane tympanique est décrite comme idéale puisque la distance parcourue par les longueurs d'onde est plus courte ce qui donne une meilleure précision à la méthode (Khalil *et al.*, 2003).

La spectroscopie de Raman utilise, quant à elle, une source de lumière externe constituées de plusieurs longueurs d'onde proches du spectre visible (NIR) absorbées spécifiquement par le glucose et autres composants sanguins (Klonoff, 1997). L'étude d'Enejder *et al.* (2005), menée chez l'Homme, s'intéresse à la fiabilité de la spectroscopie « NIR » comme méthode de mesure de glycémie chez des patients diabétiques. Les pics d'absorption du glucose sont différents de ceux des autres constituants sanguins. Une estimation fiable de la glycémie est donc donnée avec 7,8% ($\pm 1,8\%$) d'erreur. La valeur de la glycémie donnée par spectroscopie est fortement corrélée avec la valeur de glycémie obtenue sur un prélèvement sanguin avec un coefficient de 0,91 (Malchoff *et al.*, 2002 ; Yeh *et al.*, 2003). Le principal inconvénient de cette méthode repose sur la nécessité d'un calibrage régulier. En effet, l'appareil ne mesure pas uniquement un signal spécifique au glucose mais plusieurs types de signaux, non spécifiques au glucose et non relié de façon linéaire à la glycémie. Le glucose est responsable de moins de 0,1% des signaux émis par l'organisme au contraire de l'eau, du tissu adipeux, de la peau, des muscles et des os qui sont à l'origine de la majorité des signaux émis, pouvant fausser le calibrage initial (Klonoff, 1997).

- Autres méthodes

De façon plus anecdotique, des mesures d'impédance sont utilisables. En effet, les variations de glycémie plasmatiques entraînent des modifications des potentiels membranaires érythrocytaires détectables par la mesure de l'impédance (Khalil *et al.*, 2003).

D'après Yamaguchi *et al.* (1998), chez l'Homme, la concentration salivaire en glucose est corrélée de façon significative à la glycémie. Toutefois, ces résultats sont à confronter aux autres données de la littérature et notamment aux études de Mehrotra *et al.* (1968) puis Forbat *et al.* (1981) selon lesquelles aucune corrélation fiable ne pouvait être faite entre la concentration en glucose salivaire et la glycémie.

c. Comparaison des outils de mesure

Plusieurs méthodes permettent de doser la concentration en glucose dans le sang ou dans le tissu sous-cutané. Ces systèmes donnent une mesure continue ou intermittente de la glycémie avec un caractère plus ou moins invasif. L'ensemble des méthodes décrites présente une corrélation fiable entre la valeur de glycémie donnée et celle déterminée par prélèvement sanguin (Tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison des méthodes de mesure de glycémie, en comparaison avec une mesure de glycémie effectuée sur sang jugulaire.

Méthodes		Coefficient de corrélation	Avantages	Inconvénients
<i>Glycémie sur sang périphérique</i>		r=0,82 (Domori <i>et al.</i> , 2014)	-Facilement réalisable au chevet de l'animal -Taux d'erreur 10% -Indépendant de l'hématocrite	-Surestimation de 20-25% (Domori <i>et al.</i> , 2014) -Prélèvements réguliers indispensables
<i>Implant sous-cutané</i>		r=0,99 (Surman <i>et al.</i> , 2013)	-Taux d'erreur<6% (Rebrin <i>et al.</i> , 2000) -Mesures répétées non invasives -Bonne tolérance (Wiedmeyer et DeClue, 2008)	-Douleur lors de la pose -Saignements rapportés (Reineke <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ionophorèse</i>		r=0,94 (Rebrin <i>et al.</i> , 2000)	-Taux d'erreur<5% -Equilibrage rapide (<10minutes) -Mesures en continue sur 3 jours	Surestimation des glycémies basses et surestimation des glycémies élevées
<i>Spectroscopie</i>	<i>infrarouge</i>	r=0,91 (Malchoff <i>et al.</i> , 2002)	Taux d'erreur = 7,8% (Malchoff <i>et al.</i> , 2002)	Recalibrage régulier indispensable (Klonoff, 1997)
	<i>thermique</i>	r=0,73 (Yeh <i>et al.</i> , 2003)	-Non invasif -Taux d'erreur : ± 1,5mmol/L	-Complexe à mettre en œuvre en routine

L'analyse urinaire est également une méthode mini-invasive de mesure de glycémie envisageable. Si une glycosurie persistante est considérée comme pathologique chez l'adulte, elle peut tout-à-fait être normale chez le jeune en raison d'une physiologie rénale particulière permettant de l'utiliser comme témoin d'une prise énergétique correcte. De même, une protéinurie physiologique est rapportée chez le chiot. Il est alors cohérent de considérer ce paramètre comme marqueur d'une bonne prise colostrale (Moon *et al.*, 2001).

3. Physiologie rénale du chiot

1. Maturation de la fonction rénale

Au moment du part, le rein est encore à l'état de métanephros. Le système rénal est donc encore immature, sur le plan structural et fonctionnel. La néphrogenèse se poursuit pendant au moins deux semaines *post-partum* (Grundy, 2006).

Les phénomènes de maturation se font de façon centrifuge. Aschinberg *et al.* (1975) estiment, par marquage radioactif au krypton, l'évolution de la perfusion rénale du cortex. En *post-partum* immédiat, le débit sanguin est plus important dans les couches profondes du cortex, c'est-à-dire en zone juxta-glomérulaire. Dès la deuxième semaine de vie, le cortex profond et la partie externe de la medulla reçoivent plus de 50% du débit sanguin. La différenciation glomérulaire s'amorce ensuite dans le cortex superficiel. Des valeurs de perfusion comparables à celles d'un adulte sont acquises vers 6-10 semaines de vie (Obling *et al.*, 1973). Ainsi, les premiers néphrons à subir ces modifications histologiques et fonctionnelles sont ceux du cortex interne (Obling *et al.* 1973). Les néphrons les plus matures sont retrouvés en zone juxta-glomérulaire alors que de nouveaux néphrons sont continuellement formés en région subscapulaire. Le nombre de néphrons est multiplié par quatre au cours des quatre premières semaines avec la plus forte augmentation rapportée au cours des huit premiers jours (Hay et Evans., 1979). Enfin, les cellules du tubule proximal sont petites, cuboïdes avec un défaut en organites et une absence de prolongements cytoplasmiques. Ainsi, l'architecture du tubule proximal du chiot reste très différente de celle de l'adulte avec une surface réduite.

Le rein d'un chiot de moins de 20 jours présente donc un tissu non différencié à la place de la corticale limitant la filtration glomérulaire à des valeurs 20 à 50% moins importantes que chez l'adulte. L'évolution du débit de filtration glomérulaire (DFG) se fait parallèlement aux modifications structurales sans y être nécessairement associée. Différentes études ont montré que le débit de filtration glomérulaire et le flux sanguin rénal augmentent de façon importante au cours du premier mois de vie du chiot (Figure 18). La filtration glomérulaire passe de 21% à la naissance pour atteindre 53% vers l'âge de huit semaines. Ces deux facteurs continuent d'augmenter jusqu'à atteindre les valeurs de l'adulte vers dix semaines. Le débit de filtration glomérulaire passe d'une valeur de 0,13 mL/min par gramme de tissu rénal chez le chiot de 2 jours à 0,91 mL/min chez le chiot de 77 jours (Horster et Valtin 1971). Les avis des différents auteurs pré-cités divergent sur les capacités rénales de récupération hydrique. Le système rénal du chiot ne peut récupérer que 20 à 50 % de l'eau récupérée par celui d'un adulte. Les mécanismes régulant le débit de filtration glomérulaire et le flux sanguin rénal semblent complexes, leur autorégulation apparaît comme relativement inefficace en cas de changement rapide de la pression sanguine (Kleinman et Lubbe 1973).

A ceci s'ajoute des modifications hémodynamiques (augmentation du débit cardiaque, de la pression artérielle, diminution de la résistance vasculaire rénale). En effet, chez le chiot nouveau-né, le système rénine-angiotensine-aldostérone n'étant pas fonctionnel, la régulation du DFG est directement dépendante de la pression artérielle systémique et ne semble pas être modifiée sous l'action d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine jusqu'à l'âge de six semaines (Kleinman et Lubbe, 1973).

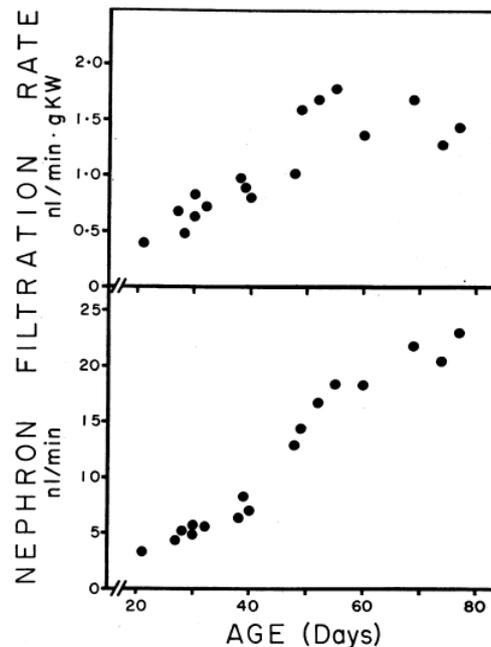


Figure 18 : Evolution du débit de filtration glomérulaire en fonction de l'âge du chiot (D'après Horster et Valtin, 1971)

2. Composition analytique de l'urine du chiot

En raison des faibles débits de filtration glomérulaire et de perfusion rénale, la protéinurie et la glycosurie sont plus importantes chez le chiot que chez l'adulte. Une glycosurie modérée est observée de façon physiologique chez les chiots de moins de 8 semaines du fait d'une réabsorption incomplète du glucose comme exposé plus haut (Shannon *et al.*, 1938). Elle est due à l'immaturité de la fonction tubulaire rénale. Une étude a même montré que l'on retrouve du glucose dans l'urine chez 50% chiots âgés de 5 jours (Bovee *et al.* 1984).

De même, la protéinurie est très fréquente de façon physiologique chez le chiot (Lane *et al.*, 2000 ; Figure 19). Bovee *et al.* affirment la retrouver dans 98% des échantillons dans des quantités variées. Les protéines peuvent être présentes sous forme de traces ou de manière plus importante. Cette présence est à corréliser avec l'immaturité glomérulaire et tubulaire rénale limitant leur réabsorption. La figure 19 modélise l'évolution de la protéinurie chez le chiot sain, évaluée de façon quantitative au moyen d'un rapport protéines urinaires sur créatinine urinaire.

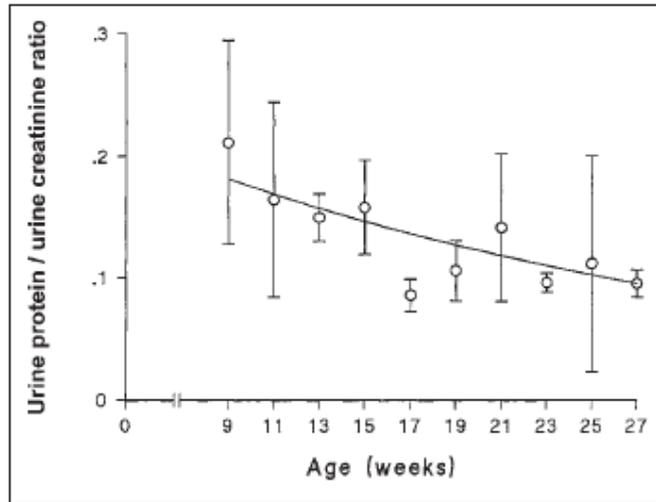


Figure 19 : Evolution quantitative de la protéinurie chez le chiot sain en fonction de l'âge (D'après Lane et al., 2000)

A la naissance, la densité urinaire moyenne est estimée à 1,022 (1,015-1,028) et dépend de la taille de la portée en étant plus élevée chez dans les petites portées (Mila et al., 2015, a). Dans les premières heures de vie, la densité chute pouvant atteindre des valeurs de 1,006 à 1,017 chez le chiot en bonne santé (Poffenbarger et al. 1990). Les valeurs de densité urinaire chez le chiot sont plus faibles que celles de l'adulte car la capacité du rein à concentrer ces urines n'est pas atteinte (Osborne et Stevens, 1999). Jusqu'à 3 semaines, la densité urinaire du chiot peut évoluer de 1,003 à 1,055. La densité urinaire du chiot atteint sa valeur définitive à partir de 4 semaines d'âge (Lane et al., 2000).

Enfin, sur une période allant de 3 à 77 jours après la naissance, la concentration urinaire augmente graduellement jusqu'à atteindre les valeurs de référence de l'adulte (Figure 20 ; Horster et Valtin, 1971).

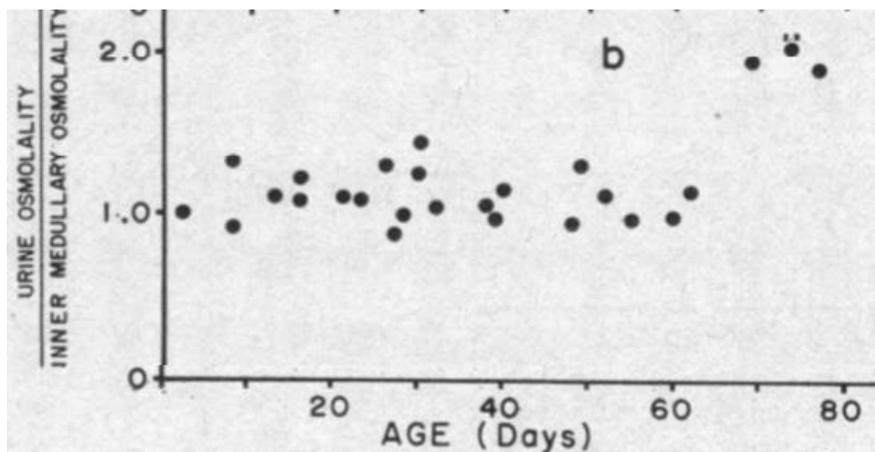


Figure 20 : Evolution de la densité urinaire en fonction de l'âge du chiot (d'après Horster et Valtin, 1971)

Ainsi, à la différence de l'adulte, le chiot présente une glycosurie et une protéinurie physiologique. Ce dernier point nous intéresse tout particulièrement dans l'évaluation du statut immunitaire du nouveau-né en envisageant la quantification de la protéinurie comme témoin de l'absorption des immunoglobulines. De même, la perméabilité tubulaire accrue au glucose permet de considérer la mesure de la glycosurie comme marqueur d'une prise énergétique correcte.

Des transferts immunitaire et énergétique corrects, assurés par la prise colostrale, sont essentiels pour assurer la survie du chiot nouveau-né. Peu d'outil sont actuellement disponibles en pratique pour contrôler la bonne prise de colostrum. Le dosage sérique des IgG par ELISA fourni un résultat fiable à l'éleveur pour connaître le statut immunitaire du chiot mais complexe à mettre en œuvre. Plusieurs méthodes alternatives sont décrites, et certaines sont déjà utilisées dans l'espèce bovine. De même, la mesure de glycémie par ponction auriculaire reste traumatisante pour le chiot et contraignante pour l'éleveur de par la nécessité de répéter les prélèvements. Des méthodes alternatives et mini-invasives existent et sont, à l'heure actuelle, essentiellement utilisées en médecine humaine dans la prise en charge des patients diabétiques. L'intérêt de la mise en pratique de tels systèmes chez le chien se pose. Enfin, l'analyse urinaire reste un moyen peu invasif d'investiguer la prise colostrale. Le rein du chiot est plus perméable que celui de l'adulte, ce qui occasionne une protéinurie et une glycosurie physiologique. Il est raisonnable de penser que la protéinurie puisse refléter la concentration sérique en IgG et que la glycosurie puisse être un témoin de la glycémie.

Cette étude va chercher à identifier des méthodes alternatives et peu invasives de détermination du statut immunitaire et énergétique du chiot nouveau-né. Dans la suite de ce manuscrit, différents paramètres sanguins et urinaires seront comparés à la concentration sérique en IgG à 48 heures mesurée par test ELISA et à la glycémie à 24 heures mesurée par ponction auriculaire. Ces deux méthodes sont respectivement considérées comme méthodes de référence dans l'évaluation du statut immunitaire et énergétique du chiot.

B. PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes

1. Sélection des animaux

Les animaux inclus sont issus d'un seul élevage français comptant 350 mères et 50 mâles de 18 races différentes. Au sein de l'élevage, le protocole annuel de vaccination concerne l'ensemble des mères et comprend les valences suivantes : Maladie de Carré, Hépatite de Rubarth, Parvovirose, Parainfluenza (vaccin Nobivac CHPPI, Intervet, Beaucouze, France). Un taux de mortalité avant sevrage de 20% est connu dans l'élevage.

Un suivi de chaleurs et de gestation chez les femelles reproductrices permet de définir une date de mise-bas. Les chiennes entrant en maternité une semaine avant la date prévue. Les mises-bas se déroulent dans une unique maternité composée de 8 salles comprenant 10 box chacune. Chaque salle étant complétée au fur et à mesure des dates de mise-bas prévues, l'âge des portées reste globalement identique dans une même salle.

Les chiots restent avec les mères en maternité jusqu'à l'âge de 8 semaines sur une litière de copeaux. Ils ont libre accès à la tétée. A partir de l'âge de 3 semaines, ils sont nourris avec des croquettes pour chiot (Starter petite ou grande taille, Royal Canin, Aimargues, France) distribuées à volonté.

Les données ont été recueillies entre le 13 octobre 2014 et le 16 décembre 2014. Un total de 336 chiots issus de 58 portées différentes ont été suivis de J0 (jour de la naissance) à J+21.

Dix-sept races ont été incluses et les chiots ont été répartis dans trois catégories en fonction du poids moyen de la race à l'âge adulte. Les races dont le poids adulte est inférieur à 10kg sont considérées comme des petits formats. Les races dont le poids adulte est compris entre 10 et 25kg sont considérées comme des formats moyens. Enfin, les races dont le poids adulte est supérieur à 25kg sont considérées comme des grands formats. Au cours des 8 premières heures de vie des chiots, ces derniers ont été identifiés à l'aide d'un collier de laine de couleur. Pour chaque individu, le sexe et la race ont été enregistrés. Les chiots présentant une fente palatine ont été d'emblée exclus de l'étude.

2. Prélèvements

Des pesées individuelles ont été réalisées à 12 heures, 24 heures et 48 heures après la naissance. Les chiots ont été pesés avec une balance Ohaus EB15 (Ohaus Corporation, Parsipanny, New Jersey, USA), d'une précision de 0,0005kg, étalonnée tous les matins à l'aide d'un poids en plomb de 2kg (Figure 21). Le taux de croissance entre 12 heures et 48 heures est calculé en appliquant la formule suivante :

$$\text{Taux de Croissance (\%)} = \frac{\text{Poids du chiot à 48h} - \text{Poids du chiot à 12h}}{\text{Poids du chiot à 12h}} \times 100$$

Une goutte de sang a été prélevée à l'oreille des chiots à 12 et 24 heures par ponction de la veine auriculaire supérieure en vue de doser une glycémie (Figure 22).

Un second type de prélèvement sanguin a été réalisé à 48 heures à la veine jugulaire afin de doser la glycémie, la protidémie totale et les concentrations sériques en PAL, GGT et IgG.

Un prélèvement d'urine a été effectué à 12, 24 et 48 heures par stimulation de la zone génitale à l'aide d'une compresse humidifiée. Une mesure de la densité urinaire ainsi que des dosages de glycosurie et protéinurie ont été mis en œuvre (Figure 23).



Figure 21 : Réalisation de la pesée



Figure 22 : Prélèvement auriculaire de sang et mesure de glycémie

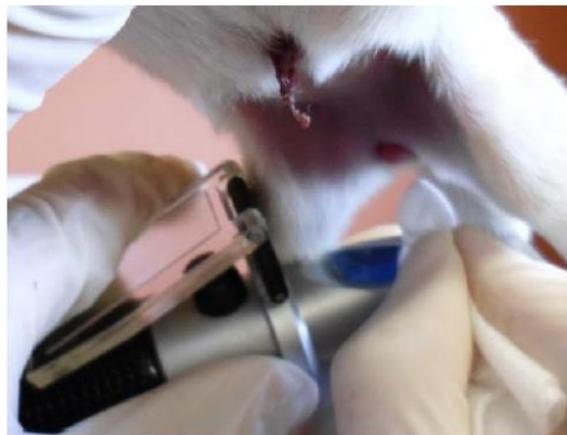


Figure 23 : Prélèvement d'urines et mesure de la densité urinaire par réfractométrie

L'ensemble des paramètres présenté précédemment n'a pas pu être obtenu sur l'ensemble du panel décrit ci-dessus. A titre d'exemple, les échantillons urinaires ou sanguins n'ont pas pu être collectés en quantité suffisante chez l'ensemble des chiots pour autoriser la mesure de l'ensemble des paramètres nécessaires à notre étude.

La chronologie des différents prélèvements réalisés est détaillée dans la figure 24.

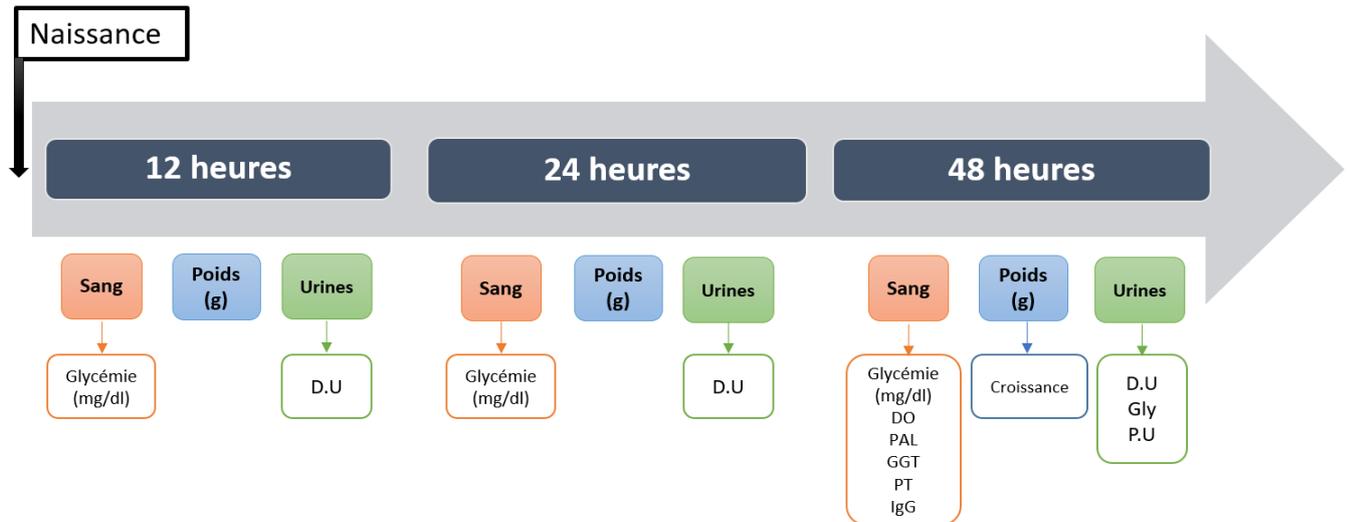


Figure 24 : Chronologie des prélèvements réalisés au cours de l'étude

D.U : Densité urinaire ; DO : Densité optique sérique ; PAL : Activité sérique des PAL (U/L) ; GGT : Activité sérique des GGT (U/L) ; PT : Protidémie totale (g/L) ; IgG : Concentration sérique en IgG (g/L) ; Gly : Glycosurie (mmol/L) ; P.U : Protéinurie (mg/L) ; Croissance : Taux de croissance entre 12 et 48 heures (%)

3. Paramètres sanguins

a. Dosage des immunoglobulines sériques

Le dosage des IgG sériques a été réalisé par test ELISA à l'aide de réactifs fournis par les laboratoires BETHYL (Montgomery, Texas, USA).

- Coating

Le coating est réalisé avec un anticorps polyclonal purifié spécifique de l'immunoglobuline G canine obtenu chez le mouton. Il est utilisé à une concentration de 0,01 mg/ml et sous un volume de 100 µL par puit. L'anticorps est dilué dans une solution de carbonate-bicarbonate (référence : Bethyl® C3041) à 0,05M pH 9,6. On incube ensuite la plaque à température ambiante durant 1 heure.

- Lavages

On vide la plaque. On réalise 5 lavages avec 200µL par puit de PBS-Tween 20 à 0,05% (pH 8) (référence : Bethyl® T9039).

- Saturation

On sature la plaque avec 200 µL par puits de PBS-BSA 1 % (pH 8) (référence : Bethyl® T6789). L'incubation dure 30 minutes à température ambiante.

- Lavages

On vide la plaque. On réalise 5 lavages avec 200 µL par puits de PBS-Tween 20 à 0,05% (pH 8) (référence : Bethyl® T9039).

- Dilution des échantillons et dépôts

La gamme et les échantillons sont préalablement dilués dans du PBS-BSA 1 % et 0,05% Tween 20. La gamme étalon, réalisée à partir d'un sérum de chien de référence à 31mg d'IgG/mL, s'étend de 0 à 500 ng/mL. Dans les cas où la concentration en IgG de l'échantillon est trop élevée pour être dosable, des dilutions au 1/50 000, voire au 1/100 000, sont effectuées.

Chaque échantillon est dosé deux fois, à deux dilutions différentes. La gamme et les échantillons sont déposés dans les puits sous un volume de 100 µL. L'incubation dure 1heure à température ambiante.

- Lavages

On vide la plaque. On réalise 5 lavages avec 200 µL par puits de PBS-Tween 20 à 0,05% (pH 8) (référence : Bethyl® T9039).

- Anticorps de révélation

L'anticorps monoclonal de révélation produit chez le mouton couplé à l'HRP (*horseradish peroxidase*) est dilué dans du PBS-BSA 1 % et 0,05% de Tween 20 à une dilution de 1/50 000. 100 µL sont ensuite déposés dans tous les puits. L'incubation dure une heure à température ambiante.

- Lavages

On vide la plaque. On réalise 5 lavages avec 200 µL par puits de PBS-Tween 20 à 0,05% (pH 8) (référence : Bethyl® T9039).

- Révélation

On dépose 100 µL de TMB (substrat de la peroxydase, référence : Bethyl® 080831). La durée de la révélation est de 15 minutes à l'abri de la lumière.

- Arrêt de la révélation

On ajoute 100 µL d'acide sulfurique H₂SO₄ 2M (référence : KPL® 50-85-04).

- Lecture

La lecture de l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre avec un laser émettant une longueur d'onde de 450 nm.

b. Dosage de la protidémie totale

Le dosage des protéines sériques totales est réalisé par spectrophométrie (VITROS 350, OrthoClinical Diagnostics, Raritan, New Jersey, USA) repose sur la mise en contact du sérum à tester avec un réactif (tartrate de cuivre). En effet, un complexe violet est formé lorsque la protéine réagit avec l'ion cuivrique (Cu²⁺) en milieu alcalin. La quantité de complexe coloré formé, proportionnelle à la quantité de protéines totales présentes dans l'échantillon, est mesurée par spectrophotométrie de réflectance à une longueur d'onde de 540nm. L'automate donne une protidémie totale pour des valeurs comprises entre 20,0g/L et 110,0g/L avec une précision allant de 0,02 à 5,0%. Le coefficient de corrélation entre la

protidémie évaluée par la méthode de Biuret, considérée comme méthode de référence et celle donnée par l'automate est de 0,999.

c. Dosage de l'activité sérique des GGT et des PAL

Le dosage des PAL et des GGT est réalisé par spectrophométrie à une longueur d'onde de 400nm (VITROS 350). La méthode de dosage des PAL repose sur l'hydrolyse du phosphate de p-nitrophényle en p-nitrophénol par les PAL à pH alcalin. Le p-nitrophénol est mesuré par spectrophotométrie de réflectance. La vitesse de modification de la densité de réflexion est convertie en activité enzymatique des PAL.

La méthode de dosage des GGT repose sur le transfert de la fraction γ -glutamyl de la L- γ -glutamyl-p-nitroanilide sur la glycylglycine, catalysé par les GGT, en produisant simultanément de la p-nitroaniline. La vitesse de modification de la densité de réflexion est mesurée puis utilisée dans le calcul de l'activité enzymatique de la GGT.

Les activités sériques des PAL et des GGT sont détectables par l'automate dans des intervalles respectifs de 20 à 1500 UI/L et 10 à 1400 UI/L. Les dosages des PAL et des GGT sont réalisés avec des précisions respectives de 0,07 à 5,2% et 0,06 à 5,3%. Ainsi, des dilutions standardisées à 7% ont été opérées par l'automate pour des concentrations supérieures à la limite de linéarité précédemment citée.

d. Réfractométrie

La réfractométrie nous a permis de mesurer les densités urinaires à 12, 24 et 48 heures ainsi que la densité optique sérique à 48 heures.

Avant chaque mesure, le réfractomètre a été étalonné avec de l'eau distillée de densité connue (1,000). Une goutte de liquide biologique à analyser était ensuite déposée sur le réfractomètre et le résultat lu. Nous avons utilisé un réfractomètre optique Atago T2-NE (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japon).

La mesure des densités urinaires s'est faite sur une échelle allant de 1,000 à 1,060 et une précision de 0,001. Pour la protidémie totale, l'échelle varie de 0,00 g/L à 120 g/L avec une précision de 2,00 g/L.

e. Mesures de glycémie

Les prélèvements pour les mesures de glycémie ont été réalisés sur une goutte de sang auriculaire. Le glucomètre utilisé est un appareil portable (FreeStyle Optium, Abbott, Illinois, USA) permettant des mesures de glycémie comprises entre 0,20 et 0,50 g/L avec une précision allant de 3,1 à 3,8%.

4. Description des méthodes de dosage mises en œuvre sur les urines

a. Dosage de la glycosurie

Le dosage du glucose urinaire a été réalisé par spectrophotométrie (VITROS 350). La méthode repose sur l'oxydation du glucose de l'échantillon catalysée par la glucose oxydase pour former du peroxyde d'hydrogène et du gluconate. Cette réaction est suivie d'un couplage oxydatif catalysé par la peroxydase en présence de précurseurs de colorant pour

produire une coloration dont l'intensité du colorant est mesurée par la lumière réfléchie (longueur d'onde de 540nm) à 37°C. Un volume minimal de 10µL est requis pour permettre le bon fonctionnement de l'automate.

L'appareil donne des mesures de glycosurie pour des valeurs comprises en 20,0mg/dL et 650,0mg/dL avec une précision estimée à 1,7%.

b. Dosage de la protéinurie

Le dosage de la protéinurie a été réalisé par un automate (Indiko, ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) par colorimétrie avec du rouge de pyrogallol (ElitechMicroprotein, Seppim, Sées, France). Ce-dernier, une fois combiné au molybdate de sodium, forme avec les protéines un complexe coloré rouge. L'intensité de la coloration, proportionnelle à la protéinurie, est mesurée par réfractométrie en milieu acide (longueur d'onde de 670 nm). Un volume minimal de 10µL est nécessaire pour réaliser la mesure. L'automate utilisé est. Des valeurs de protéinuries comprises en 5 et 200 mg/dL sont données par l'appareil avec une précision variant de 0,5 à 2,9%.

5. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm écart-type.

Les informations enregistrées sur les feuilles de suivi ont été saisies sur informatique (Excel, 2003). L'intégralité de l'étude statistique a été réalisée avec le logiciel Tanagra 1.4 (Ricco Rakotomalala, Lyon, France). Des valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Les pourcentages donnés sont calculés sur la base de l'effectif total composé de 62 chiots, tous formats confondus. Le cas échéant, les pourcentages calculés pour chaque catégorie de chiots sont calculés sur la base de 20 chiots de petit format et de 42 chiots de grand format. Pour chaque paramètre mesuré, le coefficient de variation a été calculé. Les données ont été considérées homogènes pour des valeurs inférieures à 15%.

En fonction de la normalité des valeurs, les tests de Kruskal-Wallis (non paramétrique) et T-test (pour les valeurs normales) ont été utilisés pour comparer les moyennes deux par deux de la concentration en IgG et des différents paramètres testés.

Un test du Chi² a permis d'évaluer la significativité des différences constatées entre les chiots de petit et grand formats avec un taux d'erreur accepté de 5% et un degré de liberté.

L'effet temps a ensuite été testé sur le poids, la glycémie, la densité urinaire entre 12, 24 et 48 heures. Selon le même principe, un T-test ou un test de Kruskal-Wallis ont été réalisés. Une correction de Bonferroni a été appliquée au seuil de p pour la comparaison des trois groupes deux à deux. Ainsi, une valeur p inférieure à 0,025 était considérée significative.

La corrélation entre la concentration sérique en IgG à 48 heures et les paramètres précités a été testée (Figure 25). Une régression linéaire a donc été réalisée pour chaque paramètre. Les données sont considérées corrélées dans le cas où le coefficient de corrélation « r » est supérieur à 0,4 et le seuil de probabilité « p » inférieur à 0,05. La force de la corrélation dépend de la valeur du coefficient de corrélation « r ». Ainsi, la corrélation parfaite est

obtenue pour une valeur de « r » égale à 1. Elle est forte pour des valeurs comprises entre 0,700 et 0,900, moyenne entre 0,400 et 0,600 et faible entre 0,100 et 0,300. Enfin, aucune corrélation significative n'est considérée pour des valeurs de « r » inférieures à 0,100.

Selon le même principe, la corrélation entre la glycémie et les paramètres précités a été étudiée (Figure 26).

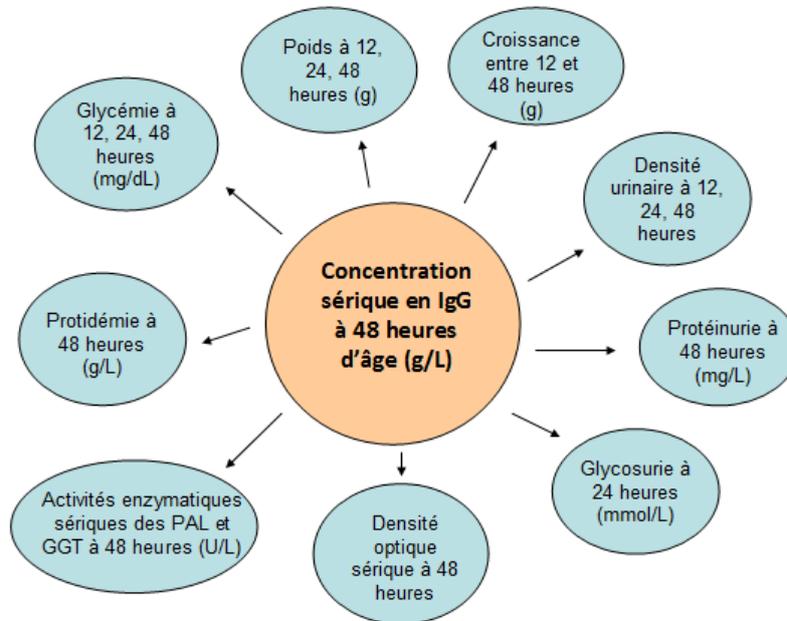


Figure 25 : Représentation des corrélations testées entre la concentration sérique en IgG (g/L) à 48 heures et les différents paramètres

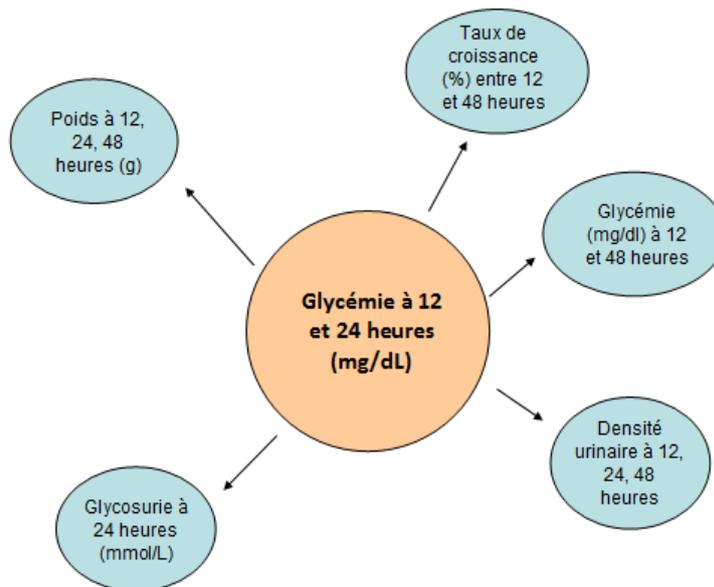


Figure 26 : Représentation des corrélations testées entre la glycémie (mg/dL) à 24 heures et les différents paramètres

Enfin, la performance des tests alternatifs a été évaluée avec l'index de Youden (Y). Pour se faire, la sensibilité et la spécificité de chaque test ont été calculées de la façon suivante :

- Sensibilité = (nombre de positifs au test) / (nombre de positifs réels)

- Spécificité = (nombre de négatifs au test) / (nombre de négatifs réels)

L'index de Youden a enfin été obtenu en appliquant la formule : $Y = Se + Sp - 1$.

II. Résultats

1. Description de la population

La population initiale comptait 354 chiots. L'ensemble des prélèvements dans des quantités suffisantes a donc été obtenue pour seulement 62 chiots de 11 races différentes. La faible taille des échantillons de chiots de petites (n=4) et moyennes races (n=16), ne nous permet pas de réaliser une analyse statistique. Aussi, dans la suite de l'étude, nous séparerons les chiots en deux catégories : les chiots de petites et moyennes races, considérés comme individus de petit format, dont le poids à l'âge adulte est inférieur à 25kg et les chiots de grandes races dont le poids à l'âge adulte est supérieur à 25kg.

Les portées sont constituées en moyenne de $5,9 \pm 2,6$ chiots nés totaux. Les petites races ont en moyenne des portées de plus petite taille, en moyenne de $4,7 \pm 1,8$ chiots, tandis que les races géantes produisent les portées les plus grandes avec une taille moyenne de $7,9 \pm 3,3$ chiots. La différence constatée n'est toutefois pas statistiquement significative ($p=0,03$, après correction de Bonferroni).

Les deux races (Cocker Spaniel et Labrador) sont les plus représentées avec 15 chiots Cocker Spaniel (soit 24% des chiots) et 15 chiots Labrador Retriever (soit 24% des chiots) provenant respectivement de 7 et 6 portées différentes (Tableau 8). Les grandes races sont les plus nombreuses, avec un total de 42 chiots (68%). En moyenne, 34% des chiots sont inclus par portée.

Le sex ratio mâle : femelle est de 0,82:1.

Tableau 8 : Répartition des chiots inclus dans l'étude en fonction de leur format racial

Format	Races	Nombre de portée(s)	Nombre total de chiots
<25kg	Bichon Frisé	1	3
	Lhasa Apso	1	1
	Cocker Spaniel	7	15
	Berger Australien	1	1
SOUS-TOTAL	4	8	20
>25kg	Bouvier Bernois	1	6
	Golden Retriever	2	8
	Labrador Retriever	6	15
	Boxer	2	8
	Berger Allemand	2	5
SOUS-TOTAL	5	13	42
TOTAL	9	21	62

2. Paramètres relatifs aux chiots

Les moyennes à l'échelle de l'effectif total (n=62 chiots) ont été calculées et sont présentées sous la forme : Moyenne \pm Ecart-Type. De même, les extrêmes de chaque paramètre dans la population ont été déterminés (Tableau 9).

Tableau 9 : Valeurs moyennes des paramètres testés à 12, 24 et 48 heures à l'échelle de la population.

IgG : Concentration sérique en IgG ; *D.O* : Densité optique sérique ; *P.T* : Concentration sérique en protéines totales ; *PAL* : Concentration sérique en PAL ; *GGT* : Concentration sérique en GGT ; *D.U* : Densité urinaire ; *P.U* : Protéinurie
- : Paramètre non mesuré sur la période considérée

Paramètres évalués

	Poids (g)	Croissance (%)	IgG (g/L)	D.O	Glycémie (mg/dl)	P.T (g/L)	PAL (U/L)	GGT (U/L)	D.U	P.U (mg/L)	Glycosurie (mmol/L)
<i>12h</i>	392,3 ± 103,1 (174 – 634)	4,1 ± 8,9 (-13,7 – 20,7)	-	-	123,5 ± 38 (60 - 235)	-	-	-	1,03 ± (0,01) (1,01 - 1,05)	-	-
<i>24h</i>	396,2 ± 103,5 (172 – 650)		-	-	125 ± 42,7 (41 - 147)	-	-	-	1,02 ± 0,06 (1,00 - 1,04)	-	-
<i>48h</i>	406,0 ± 108,3 (186 – 692)		3,7±3,2 (0,34 – 17,3)	3,5 ± 0,31 (2,6 - 4,4)	107 ± 34,4 (29 - 177)	42,6 ± 4,75 (30,8 - 54,9)	658 ± 494 (256 - 3 024)	266 ± 199 (49 - 1 097)	1,01 ± 0,05 (1,00 - 1,03)	322 ± 584 (26 - 4 461)	0,71 ± 0,15 (0,50 - 1,1)

a. Poids des chiots

A 12 heures, le poids moyen des chiots est de 392,3g ($\pm 103,1$ g) avec des extrêmes allant de 174 à 634g. Il est de 290,2g ($\pm 64,9$ g) chez les chiots de petit format à l'âge adulte et de 444,6g ($\pm 76,4$ g) chez les chiots de grand format. A 24 heures, le poids moyen des chiots est de 396,2g ($\pm 103,5$ g) avec des extrêmes allant de 172 à 650g. Il est de 302,3g ($\pm 71,2$ g) chez les chiots de petit format à l'âge adulte et de 444,3g ($\pm 82,5$ g) chez les chiots de grand format. A 48 heures, le poids moyen des chiots est de 406,0g ($\pm 108,3$ g) avec des extrêmes allant de 186 à 692g. Il est de 322,7g ($\pm 71,6$ g) chez les chiots de petit format à l'âge adulte et de 448,7g ($\pm 99,0$ g) chez les chiots de grand format.

A 12, 24 et 48 heures, une différence significative de poids ($p < 0,001$) est mise en évidence entre les chiots des deux catégories.

Chez les chiots de petit format, une prise de poids significative est objectivée entre 12 et 24 heures, 24 et 48 heures et enfin 12 et 48 heures ($p < 0,001$). En revanche, chez les chiots de grand format, aucune modification de poids significative n'a été soulignée ($p > 0,025$ après application de la correction de Bonferroni) que ce soit entre 12 et 24 heures, 24 et 48 heures ou 12 et 48 heures (Figure 27).

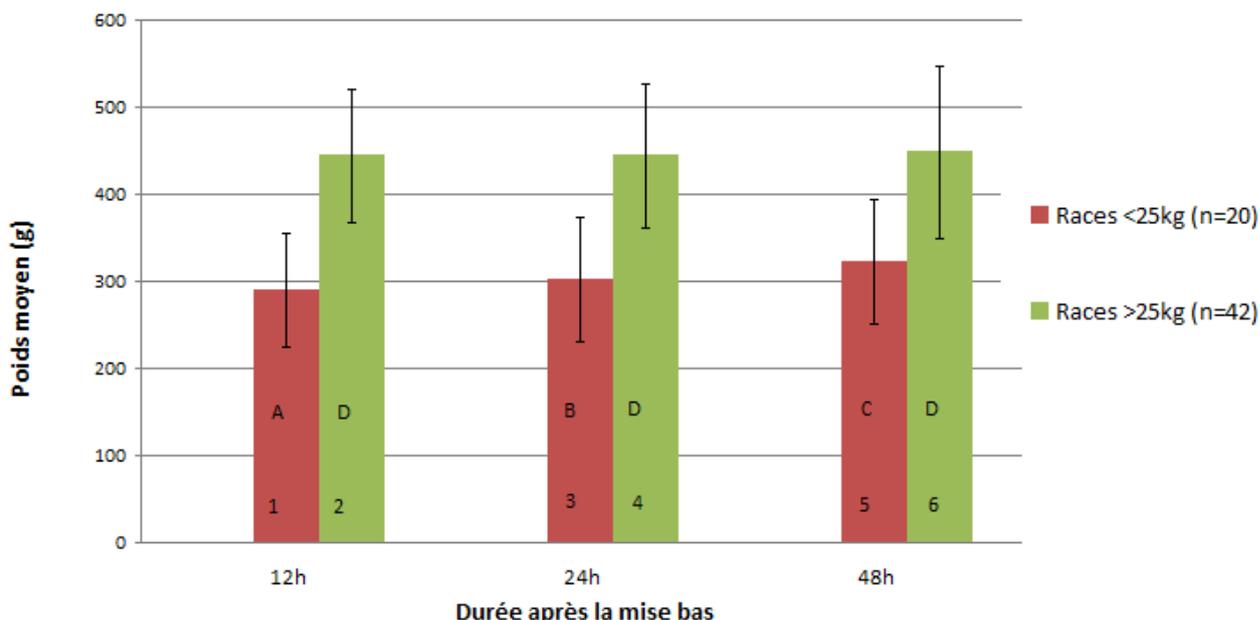


Figure 27 : Poids des chiots (g) en fonction des formats raciaux à 12 heures, 24 heures et 48 heures

Les boîtes avec une lettre différente (A,B, C ou D) ont des moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$ dans un même format racial.

Les boîtes avec un chiffre différent (1,2,3,4,5 ou 6) ont des moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$ entre formats raciaux, au même âge.

b. Croissance

Le taux de croissance moyen de l'effectif entre 12 et 48 heures est de 4,1% ($\pm 8,9$ %) avec des extrêmes allant de -13,7% à 20,7% avec un coefficient de variation estimé à 218% (Figure 28). La croissance moyenne des chiots de petit format est de 11,4% ($\pm 5,36$ %) alors qu'elle est de 0,35% ($\pm 8,33$ %) chez les chiots de grand format. L'écart de taux de croissance entre les deux catégories est significatif ($p < 0,001$).

Un taux de croissance inférieur à 4% (Mila *et al.*, 2015b) est reconnue comme étant une valeur seuil permettant de repérer les chiots à risque accru de mortalité. Dans notre effectif

total, 21% de la population (soit un total de 13 chiots), dont 100% de chiots de grand format, présentent une croissance inférieure à ce seuil entre les 12 et 48 premières heures suivant la mise bas.

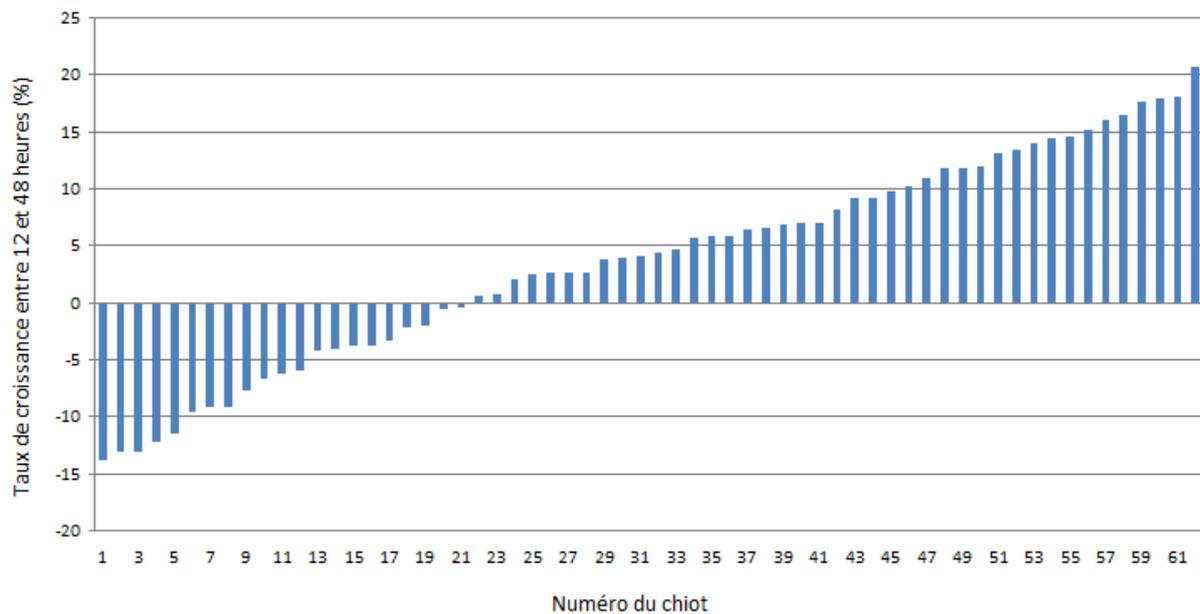


Figure 28 : Taux de croissance entre 12 heures et 48 heures d'âge. Chaque chiot est représenté par un chiffre sur l'axe des ordonnées.

c. Paramètres sériques

- Concentration sérique en IgG

La valeur moyenne de la concentration sérique en IgG est de 3,7g/L (\pm 3,2g/L) avec des extrêmes allant de 0,34g/L à 17,3g/L (Figure 29). La concentration moyenne sérique en IgG chez les chiots de petit et grand format est respectivement de 1,1g/L (\pm 3,1g/L) et 4,8g/L (\pm 2,1g/L). Une différence significative de cette concentration sérique est objectivée entre les chiots des deux types de formats raciaux ($p < 0,001$) avec une globulinémie significativement supérieure chez les chiots de grand format. Le coefficient de variation dans la population est de 87,8%.

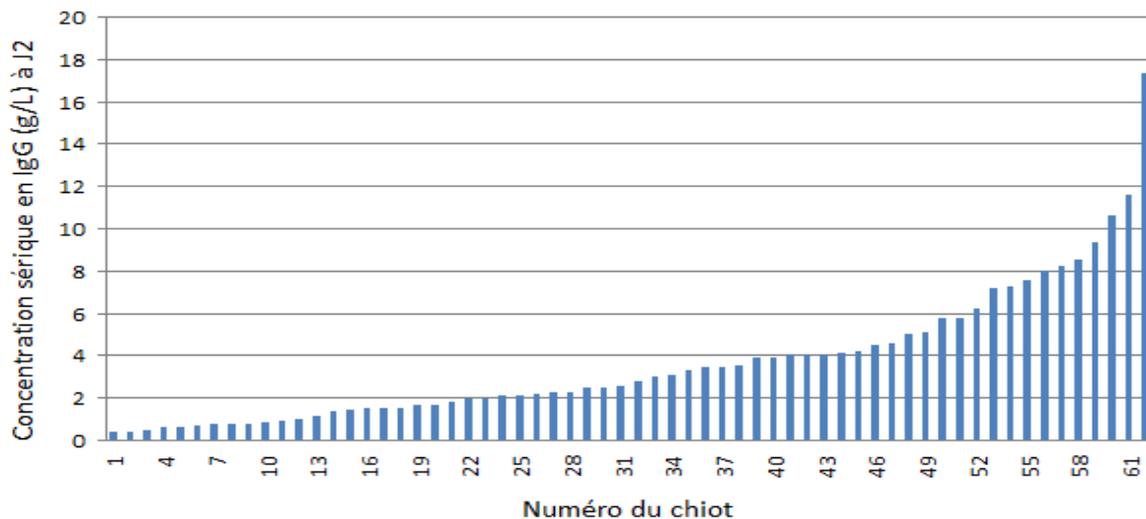


Figure 29 : Concentrations sériques en IgG (g/L) à J2 (n=62)

Les chiots sont en déficit de transfert d'immunité passive lorsque la concentration sérique en IgG est inférieure à 2,3g/L à 48 heures d'âge (Mila *et al.*, 2014).

Notre effectif présente 28 chiots avec une concentration sérique en IgG inférieure à 2,3g/L ce qui représente 45 % de la population. On dénombre 4 chiots soit 6% de la population sous cette valeur seuil dans les races inférieures à 25kg et 24 chiots soit 39% parmi les chiots de grand format. Cette différence est significative ($\chi^2=0,006$ avec $p<0,05$; Figure 30).

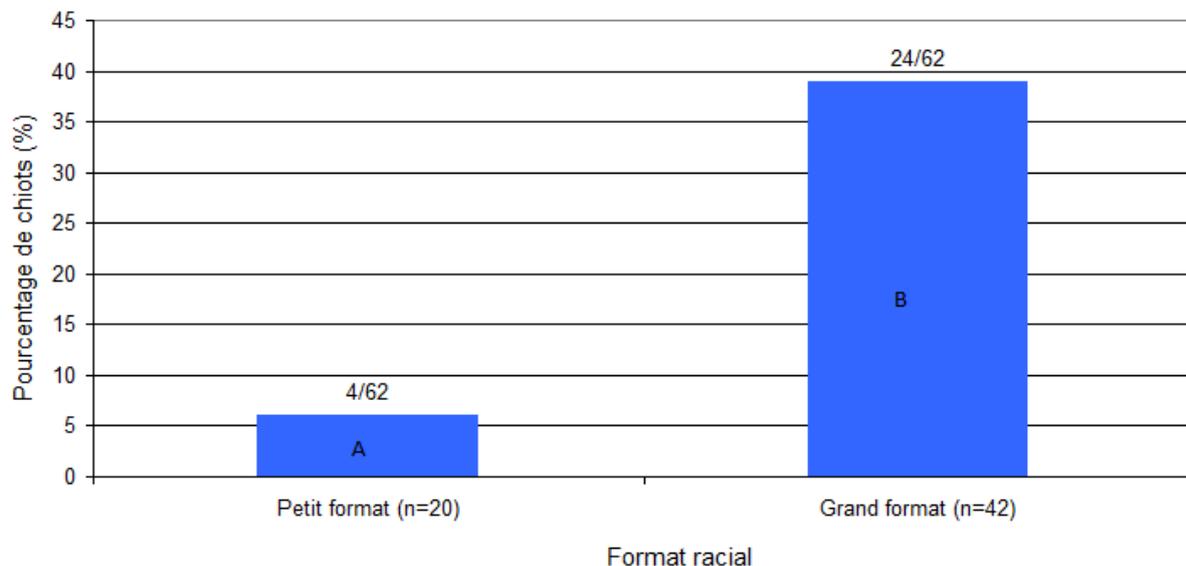


Figure 30 : Prévalence du déficit du transfert de l'immunité passive en fonction du format racial

Les boîtes avec une lettre différente (A ou B) ont des moyennes significativement différentes au seuil de $p<0,05$ dans un même format racial.

- Densité optique sérique

La valeur moyenne de la densité optique sérique dans la population est estimée à 3,5 ($\pm 0,31$) avec des extrêmes allant de 2,6 à 4,4.

Le coefficient de variation est de 8,8% (Figure 31). La densité optique moyenne est de 3,1 ($\pm 0,27$) et de 3,8 ($\pm 0,23$) chez les chiots de petit et grand format respectivement. Ce paramètre est donc significativement supérieure ($p<0,001$) chez les chiots de grand format.

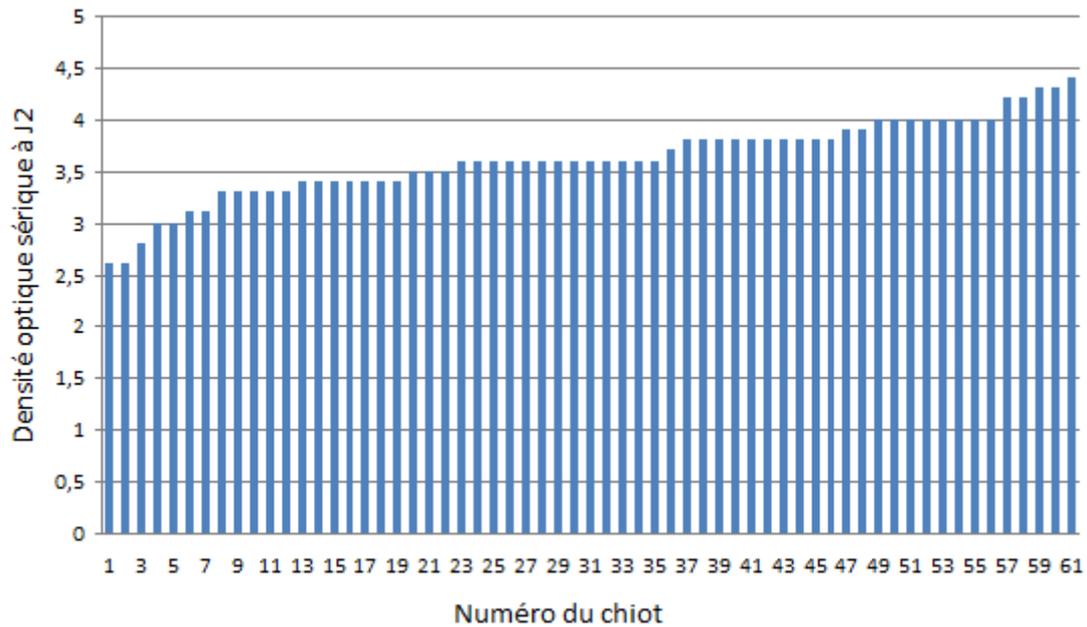


Figure 31 : Valeurs de la densité optique sérique à J2 (n=62)

- Glycémie

A 12 heures, la glycémie moyenne des chiots est de 123 mg/dL (± 38 mg/dL) avec des extrêmes allant de 60 à 235 mg/dL. La glycémie est de 142 mg/dL (± 40 mg/dL) pour les petites races et de 112 mg/dL (± 30 mg/dL) pour les grandes races.

A 24 heures, elle est de 125 mg/dL ($\pm 42,7$ mg/dL) avec des extrêmes allant de 41 mg/dL à 147 mg/dL. La glycémie est de 139 mg/dL (± 30 mg/dL) pour les petites races et de 122 mg/dL (± 42 mg/dL) pour les grandes races

A 48 heures, la glycémie moyenne est enfin de 107mg/dL ($\pm 34,4$ mg/dL) avec des extrêmes allant de 29mg/dL à 177mg/dL. Plus précisément, elle est de 143mg/dL ($\pm 39,9$ mg/dL) chez les chiots de petite race à l'âge adulte et de 112mg/dL ($\pm 29,8$ mg/dL) chez les chiots de grande race (Figure 32).

La glycémie est significativement différente entre les deux catégories de chiots à 12 heures uniquement ($p=0,001$ à 12 heures ; $p>0,025$ à 24 et 48 heures, après application de la correction de Bonferroni). Chez les chiots de petit format, une diminution de la glycémie significative, de 140mg/dL à 118mg/dL, est objectivée entre 24 et 48 heures ($p=0,02$). Chez les chiots de grand format, aucune baisse de la glycémie significative n'est mise en évidence entre 24 et 48 heures de vie ($p>0,025$ après application de la correction de Bonferroni).

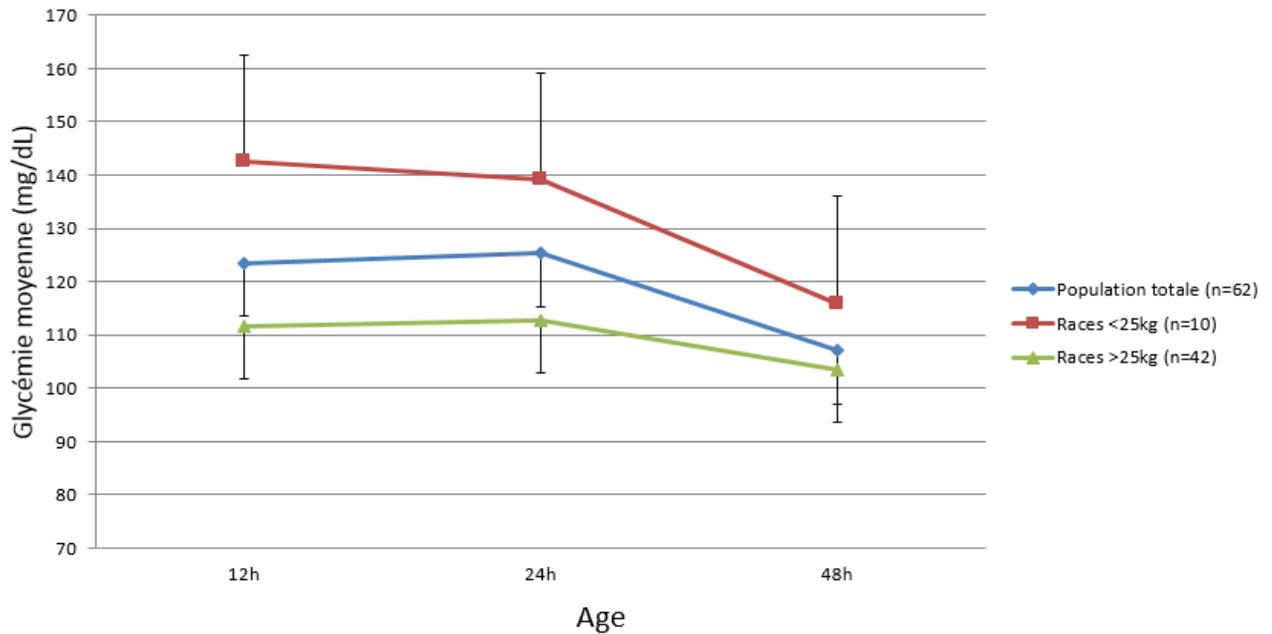


Figure 32 : Evolution de la glycémie (mg/dL) de l'effectif total (n=62), des races de petit format racial (n=20) et de grand format racial (n=42).

Résultats présentés sous la forme Moyenne \pm Ecart-type

Les chiots sont en déficit énergétique lorsque la glycémie est inférieure à 92 mg/dL à 24 heures d'âge (Mila *et al.*, 2015a).

Dans l'effectif total, on dénombre 23%, 19% et 27% de chiots avec une glycémie inférieure à 92mg/dL respectivement à 12 heures, 24 heures et 48 heures. Plus précisément, à 12 heures, on retrouve 5 chiots (8%) de petit format et 9 chiots (15%) de grand format dans ce cas. A 24 heures, c'est le cas de 1 chiot (2%) de petit format et 12 chiots (19%) de grand format. Enfin, à 48 heures, on retrouve 10 chiots (16%) de petit format et 8 chiots (13%) de grand format (Figure 33). Ces différences sont significatives à 12, 24 et 48 heures ($\chi^2=0,75$, 0,003 et 0,006 respectivement).

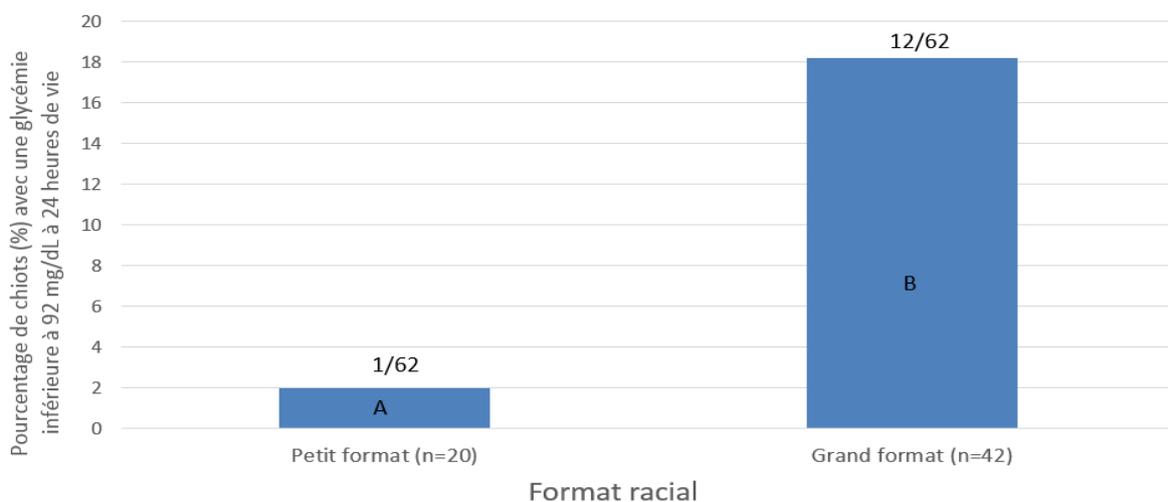


Figure 33 : Prévalence de l'hypoglycémie (glycémie inférieure à 92mg/dL) en fonction du format racial.

Les boîtes avec une identification différente (A ou B) ont des moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$ dans un même format racial.

- Protidémie totale

La valeur moyenne dans la population est estimée à 42,6 g/L ($\pm 4,75$ g/L) avec des extrêmes allant de 30,8 à 54,9 g/L (Figure 34). La protidémie est significativement ($p < 0,01$) inférieure chez les chiots de grand format (41,7g/L $\pm 4,48$ g/L) comparativement aux chiots de petit format (48,4 g/L $\pm 4,12$ g/L). Le coefficient de variation est de 11,2% sur l'effectif total. Chez les chiots de races inférieures à 25kg, il est de 9,3% alors que chez les chiots de grand format il est de 11,6%.

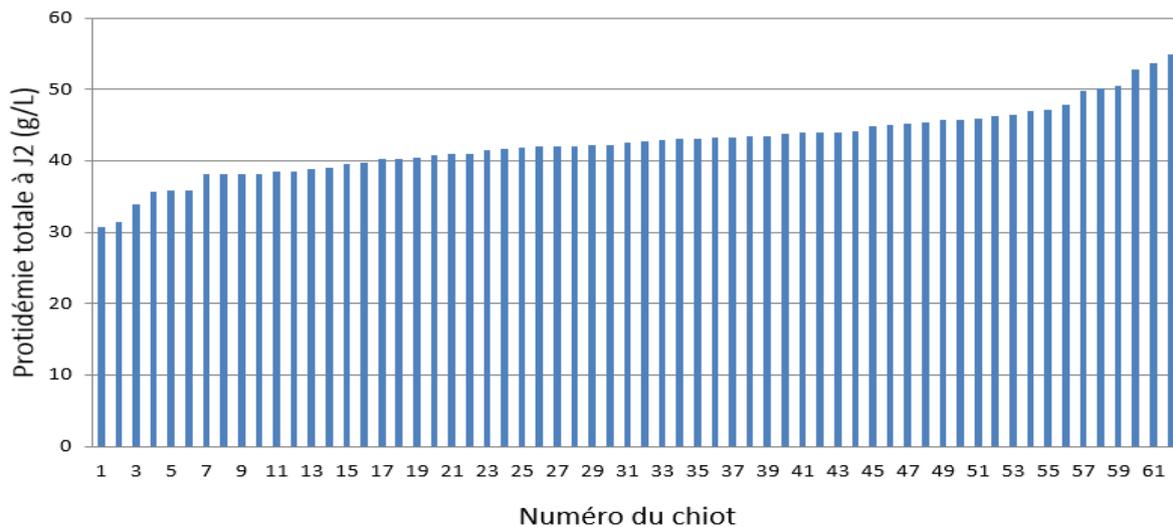


Figure 34 : Protidémie (g/L) mesurée à J2 (n=62)

- Activité enzymatique sérique des PAL et des GGT

Les valeurs moyennes des activités sériques des PAL et des GGT sont respectivement de 658 U/L (± 494 U/L) avec des extrêmes allant de 256 à 3 024 U/L et de 266 U/L (± 199 U/L) avec des extrêmes allant de 49 à 1 097 U/L pour les GGT (Figure 35 et 36). Aucune différence significative de l'activité sérique des PAL et des GGT ($p=0,80$ et $p=0,07$ respectivement) n'a été mise en évidence entre les deux formats raciaux (Figure 37).

Le coefficient de variation de l'activité sérique des PAL dans l'effectif total est de 75,1%, il est de 81,6% chez les chiots de petit format et de 23,2% chez les chiots de grand format. Le coefficient de variation de l'activité sérique des GGT dans la population est de 75,2%.

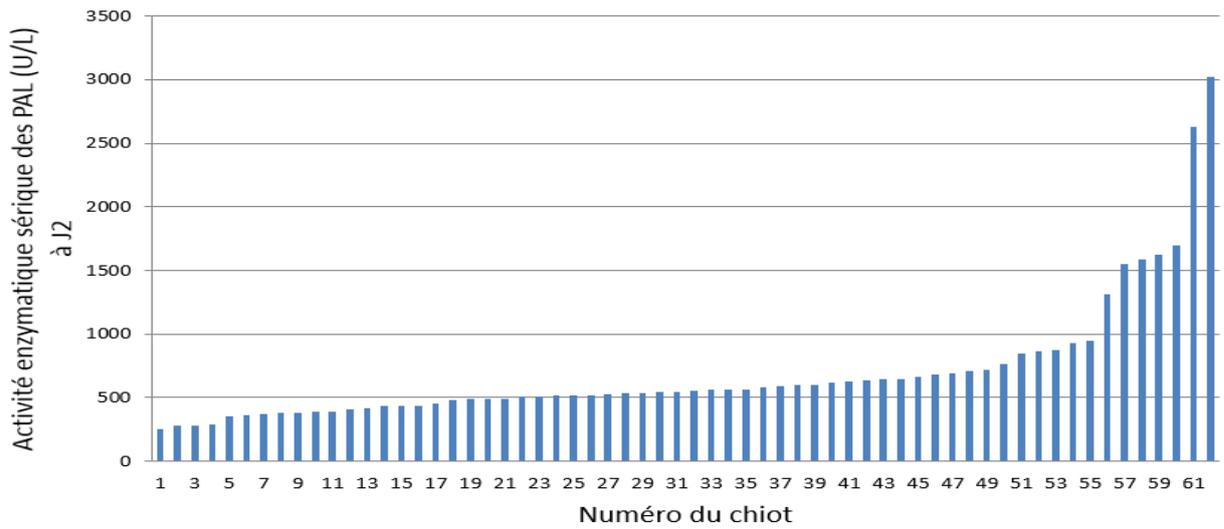


Figure 35 : Activité enzymatique sérique (U/L) des PAL à J2 (n=62)

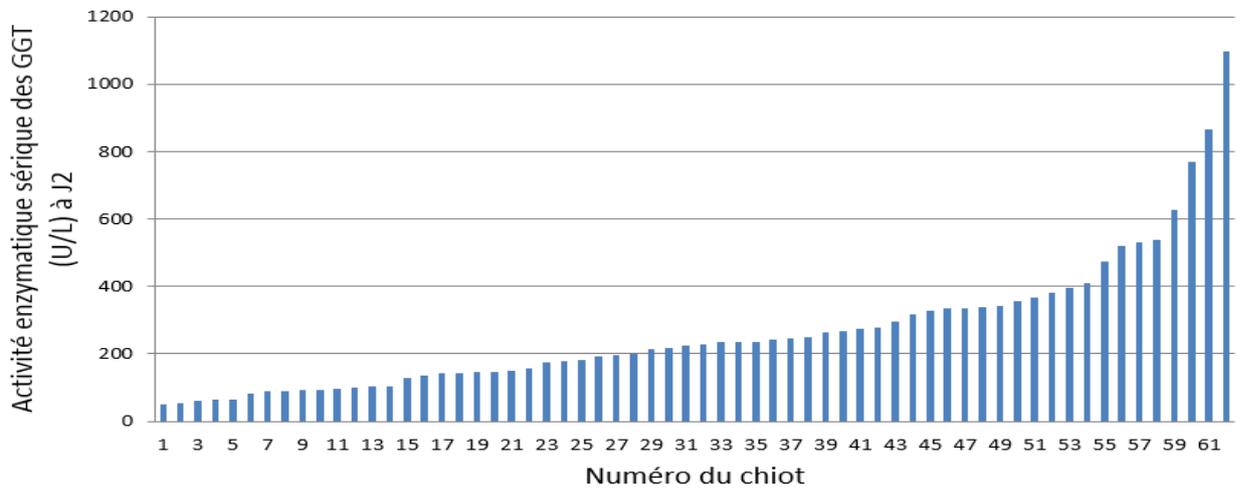


Figure 36 : Activité enzymatique sérique (U/L) des GGT à J2

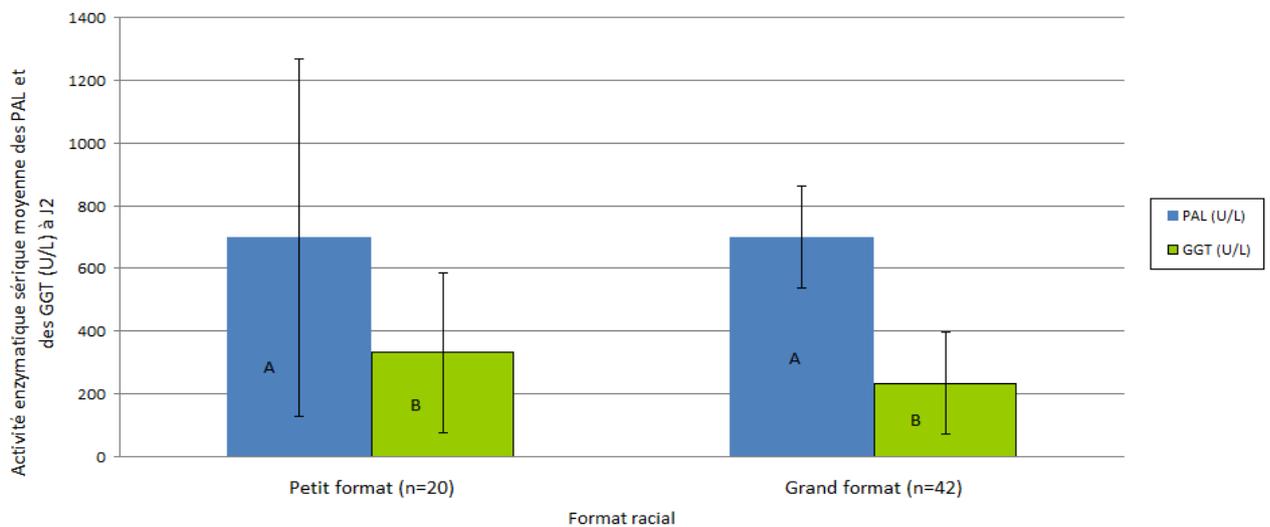


Figure 37 : Activité enzymatique sérique des PAL et des GGT (U/L) en fonction des formats raciaux à J2
Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$

d. Paramètres urinaires

- Densité urinaire

A 12 heures, la densité urinaire moyenne à l'échelle de la population est de 1,03 ($\pm 0,01$) des extrêmes allant de 1,01 à 1,05. A 24 heures, elle est de 1,02 ($\pm 0,06$) avec des extrêmes allant de 1,00 à 1,04. Enfin, à 48 heures elle est de 1,01 ($\pm 0,05$) avec des extrêmes allant de 1,00 à 1,03 (Figure 38). Les coefficients de variation à 12, 24 et 48 heures sont respectivement de 0,84%, 0,66% et 0,59%.

Chez les chiots de petit format, les densités urinaires moyennes à 12, 24 et 48 heures sont respectivement de 1,02 ($\pm 0,09$), 1,02 ($\pm 0,09$) et 1,07 ($\pm 0,05$). Chez les chiots de grand format, elles sont respectivement de 1,03 ($\pm 0,08$), 1,02 ($\pm 0,05$) et 1,02 ($\pm 0,06$) à 12, 24 et 48 heures respectivement. Une différence significative de densité urinaire ($p < 0,001$) est observée entre les deux catégories de chiots à 48 heures uniquement ($p = 0,07$ et $0,51$ à 12 et 24 heures respectivement). Chez les chiots de petite race, une diminution significative ($p = 0,003$) est observée entre 24 et 48 heures. Chez les chiots de grand format, une diminution significative du paramètre est objectivée entre 12 et 24 heures ($p = 0,001$).

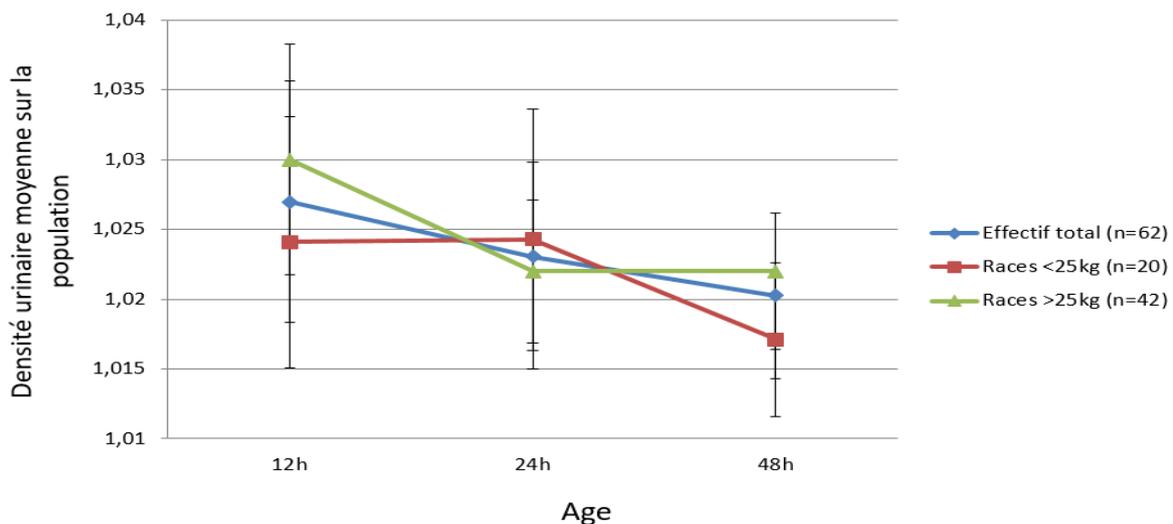


Figure 38 : Evolution de la densité urinaire de l'effectif total ($n=62$), chez les chiots de petite race ($n=20$) et chez les chiots de grande race ($n=42$)

Résultats présentés sous la forme Moyenne \pm Ecart-type

- Protéinurie

La valeur moyenne de la protéinurie à 48 heures dans la population est de 322mg/L (± 584 mg/L) avec des extrêmes allant de 26 à 4 461 mg/L (Figure 39). Chez les chiots de petit format, elle est de 269mg/L (± 213 mg/L) alors que chez les chiots de grand format elle est estimée à 683mg/L (± 374 mg/L). La protéinurie est significativement plus élevée chez les chiots de grand format ($p = 0,02$). Le coefficient de variation dans l'effectif est de 181,2%, il est de 125,6%.

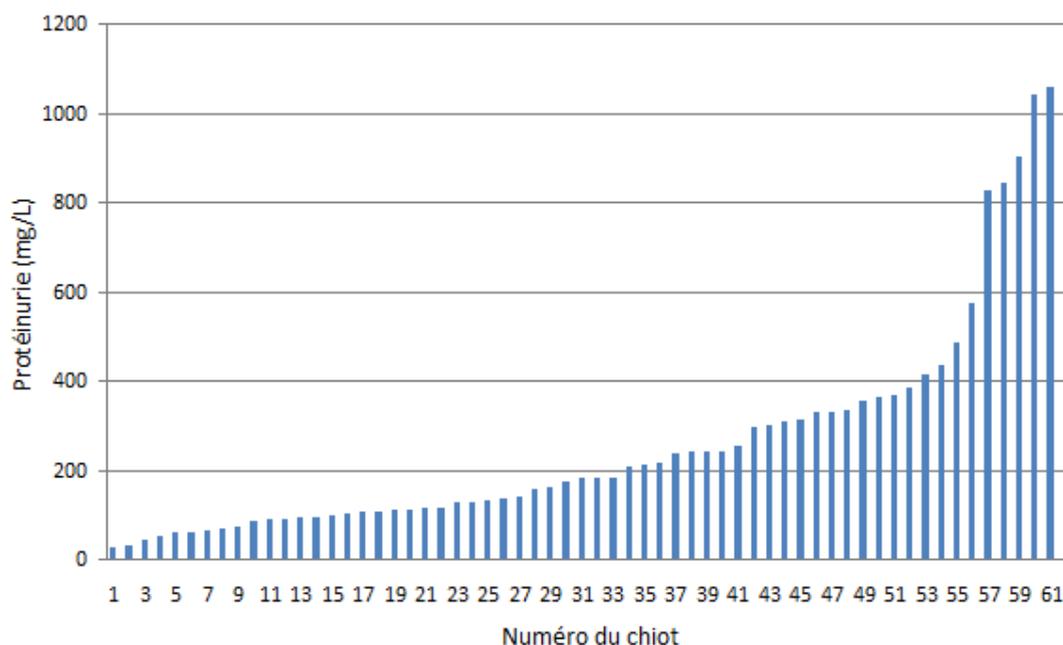


Figure 39 : Protéinurie (mg/L) à J2 (n=62)

- Glycosurie

La glycosurie moyenne à 24 heures à l'échelle de la population est estimée à 0,71mmol/L ($\pm 0,15$ mmol/L) avec des extrêmes allant de 0,5 à 1,1mmol/L (Figure 40). La glycosurie moyenne dosée chez les chiots de petit format est de 0,72mmol/L ($\pm 0,14$ mmol/L) alors qu'elle est de 0,70mmol/L ($\pm 0,16$ mmol/L) chez les chiots de grand format. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les chiots des deux formats raciaux ($p=0,60$). Le coefficient de variation dans la population est de 19,4%.

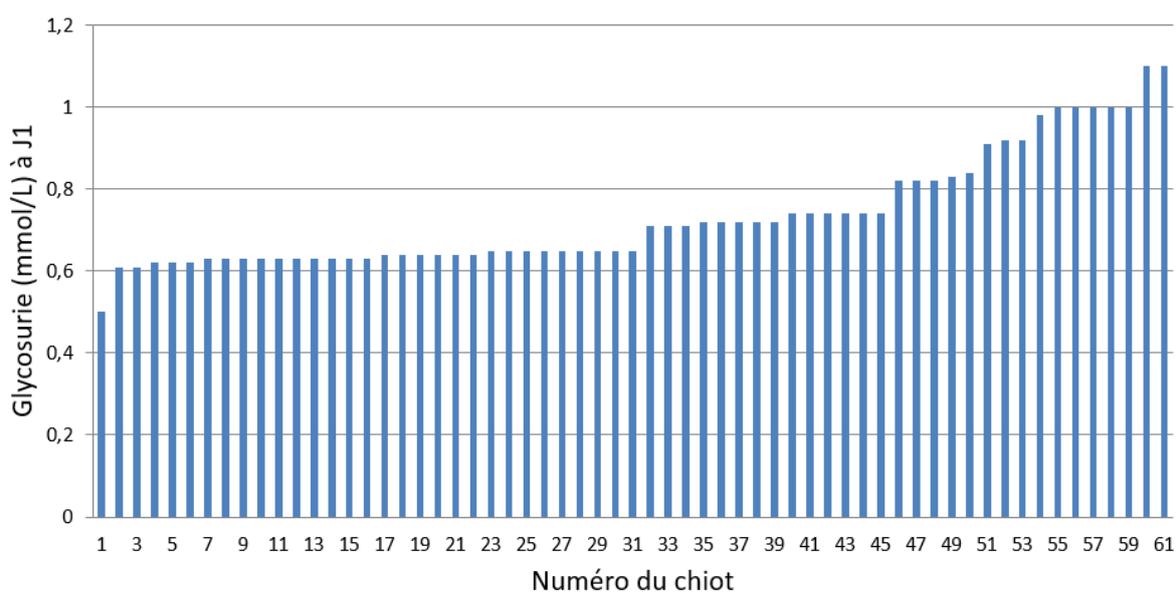


Figure 40 : Glycosurie (mmol/L) à J1 mesurées (n=62)

3. Corrélations entre les différents paramètres

a. Corrélations entre la concentration sérique en IgG et les différents paramètres

- Paramètres testés à 12 heures

Parmi les paramètres testés à 12 heures, seul le poids des chiots est lié significativement à la concentration sérique en IgG ($r=-0,366$) avec une corrélation faible. Inversement, aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la globulinémie et la densité urinaire ($r=0,071$) ou encore la glycémie ($r=0,175$).

D'un point de vue qualitatif, les chiots présentant une concentration sérique en IgG inférieure à 2,3g/L à 48 heures ont un poids significativement plus faible ($p=0,002$) à 12 heures (Tableau 10 ; Figures 41, 42, 43).

Tableau 10 : *Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et les paramètres testés à 12 heures (n=62)*

* : Mise en évidence d'une corrélation significative

	Poids à 12 heures d'âge (g)*	Densité urinaire	Glycémie (mg/dL)
Coefficient de corrélation « r »	$r=-0,366^*$	$r=0,071$	$r=0,175$
Probabilité « p »	$p=0,002^*$	$p=0,669$	$p=0,229$
Corrélation	Faible*	Nulle	Nulle

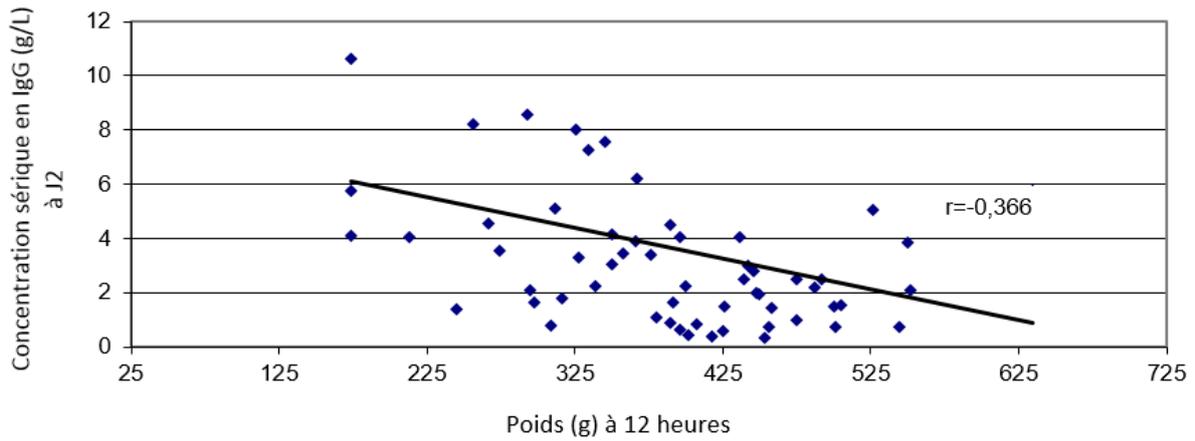


Figure 41 : *Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le poids (g) à 12 heures (n=62)*

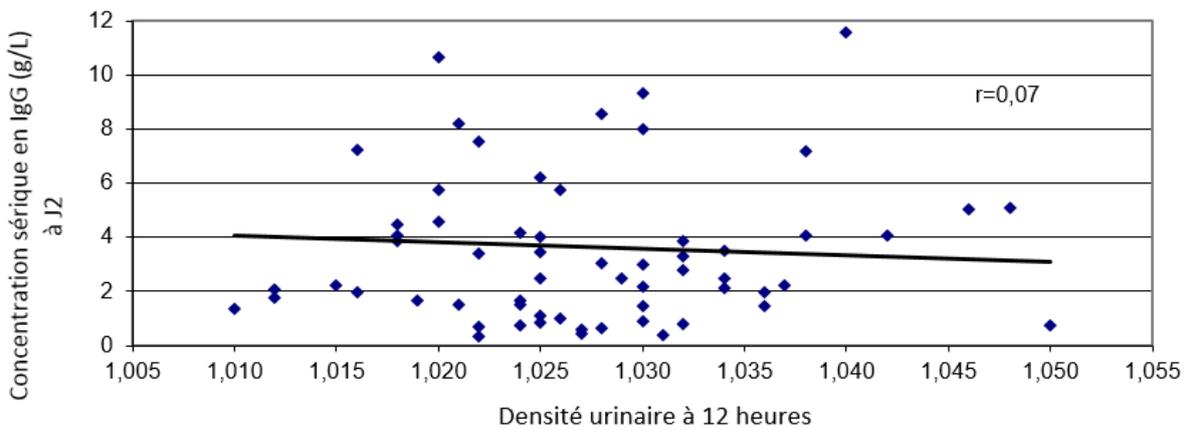


Figure 42 : *Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité urinaire à 12 heures (n=62)*

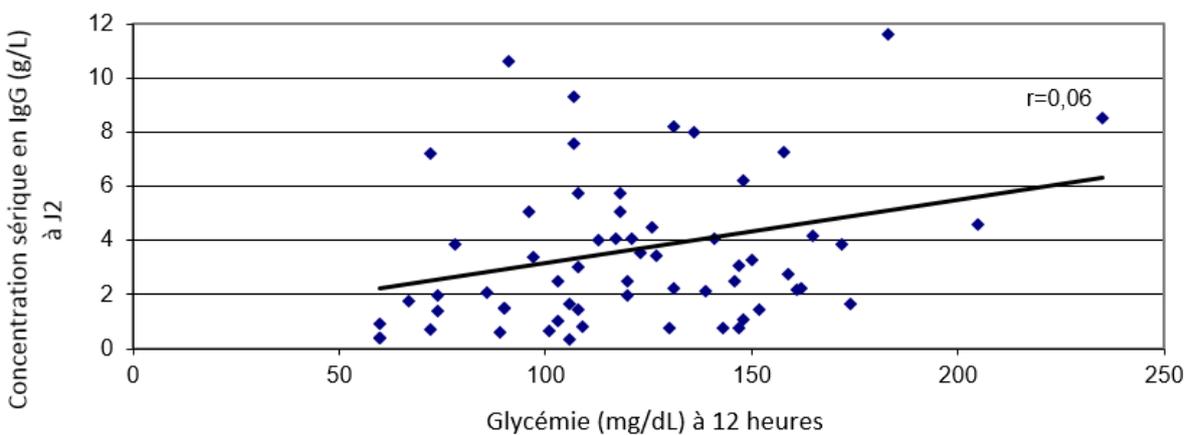


Figure 43 : *Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à 12 heures (n=62)*

- Paramètres testés à 24 heures

Parmi les paramètres testés à 24 heures, la densité urinaire ($r=0,315$), la glycémie ($r=0,341$) et la glycosurie sont significativement corrélés à la concentration sérique en IgG à 48 heures (Tableau 11, Figures 44 à 47). Ces trois derniers indicateurs sont tous faiblement corrélés avec la concentration sérique en IgG. La glycémie, la glycosurie et la densité urinaire sont plus faibles ($p=0,024$, $p=0,028$ et $p=0,032$ respectivement) chez les chiots présentant une concentration en IgG inférieure à 2,3g/L comparativement aux chiots ne présentant pas de défaut de transfert d'immunité (Figures 48 à 50).

Le poids des chiots à 24 heures ne montre pas de corrélation fiable ($r=-0,270$) avec la concentration sérique en IgG.

Tableau 11 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et les paramètres testés à 24 heures (n=62)

* : Mise en évidence d'une corrélation significative

	Poids à 24 heures d'âge (g)	Densité urinaire*	Glycémie (mg/dL)*	Glycosurie* (mmol/L)
Coefficient de corrélation « r »	$r=-0,270$	$r=0,315^*$	$r=0,341^*$	$r=0,314^*$
Probabilité « p » Corrélation	$p=0,061$ <i>Nulle</i>	$p=0,032^*$ <i>Faible</i>	$p=0,024^*$ <i>Faible</i>	$p=0,028^*$ <i>Faible</i>

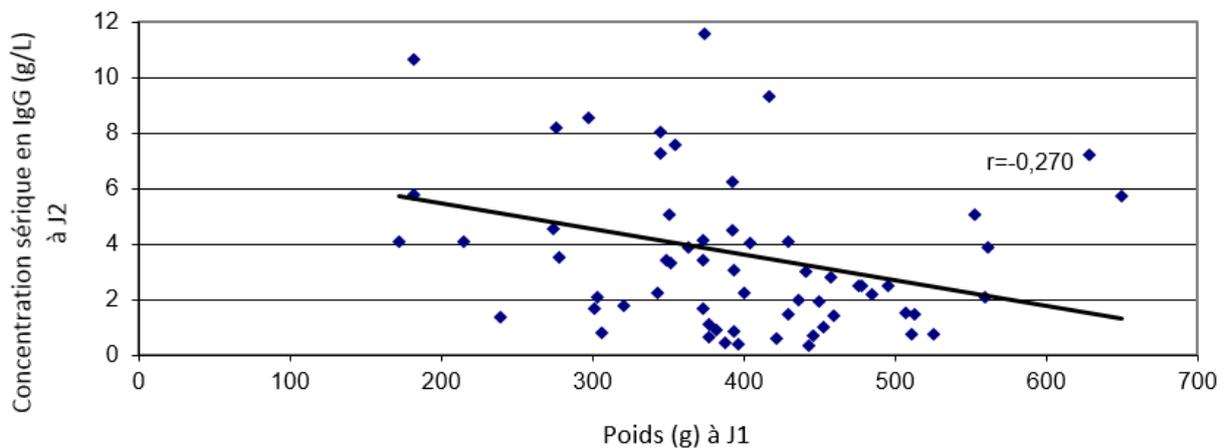


Figure 44 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le poids (g) à 24 heures (n=62)

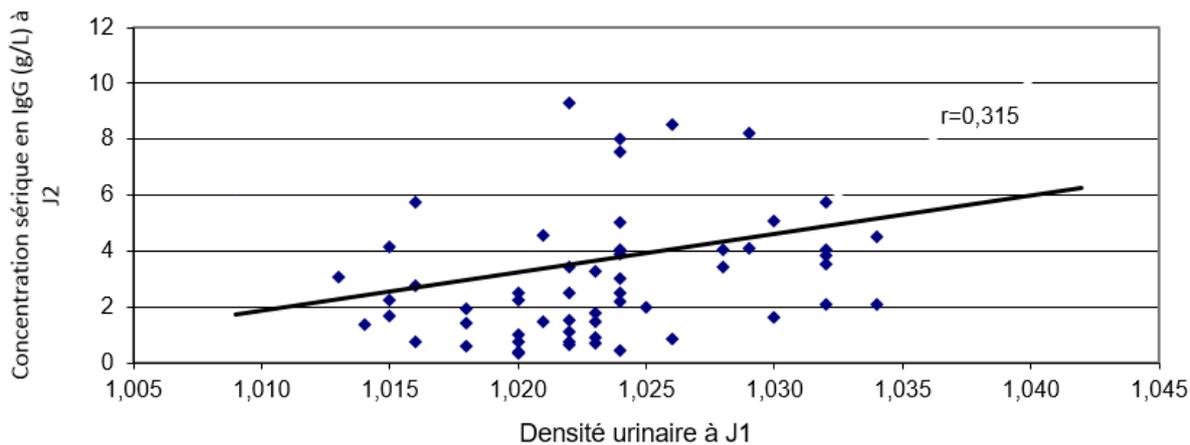


Figure 45 : *Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité urinaire à 24 heures (n=62)*

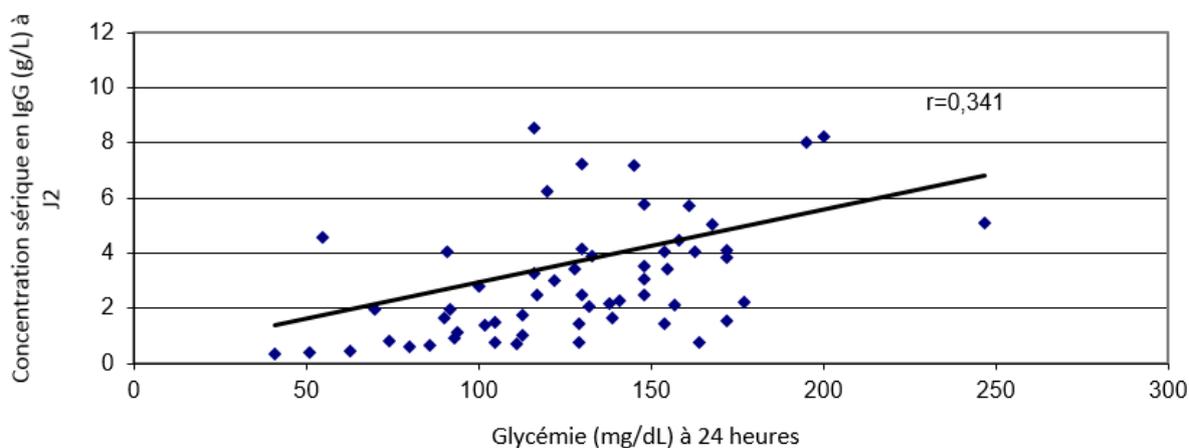


Figure 46 : *Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à 24 heures (n=62)*

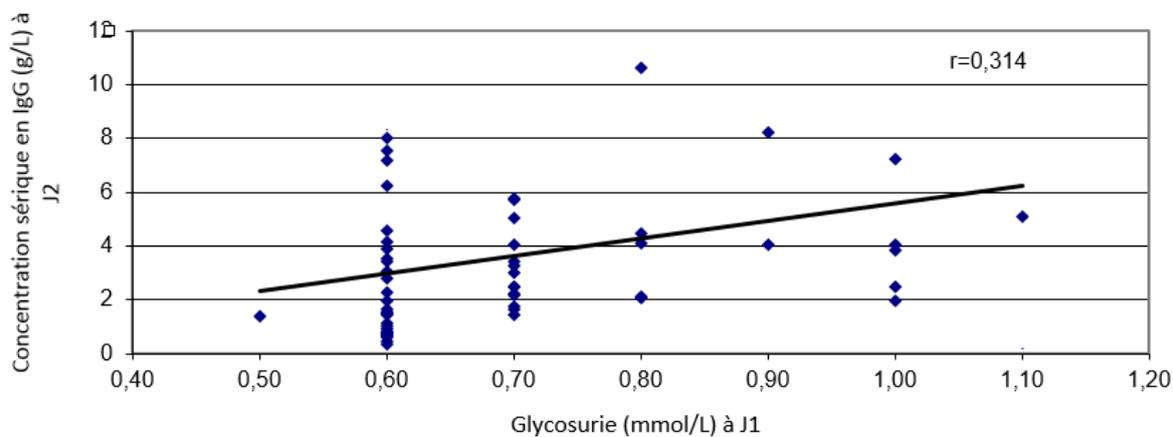


Figure 47 : *Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à 24 heures (n=62)*

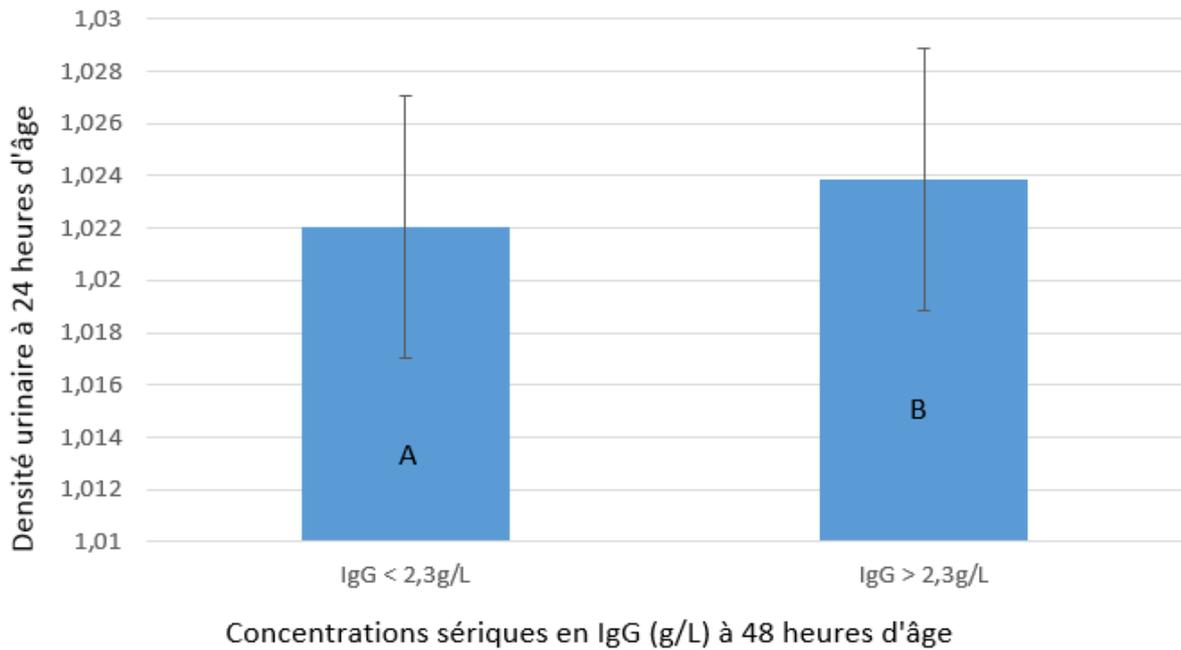


Figure 48 : Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité urinaire à J1

Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$

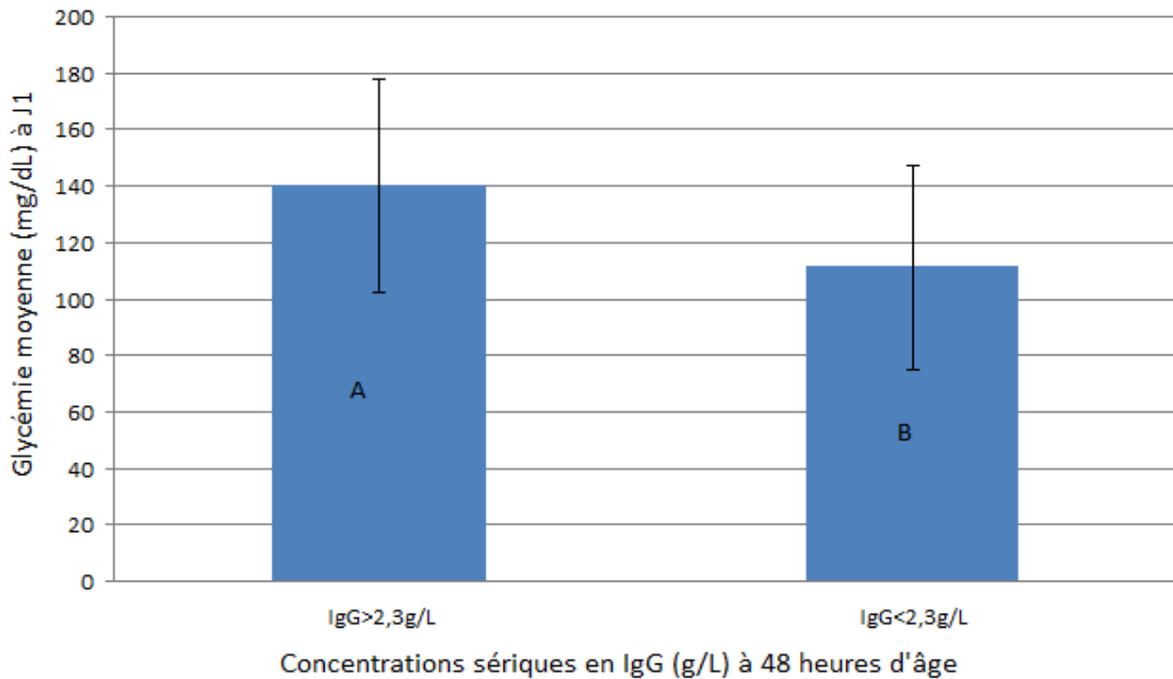
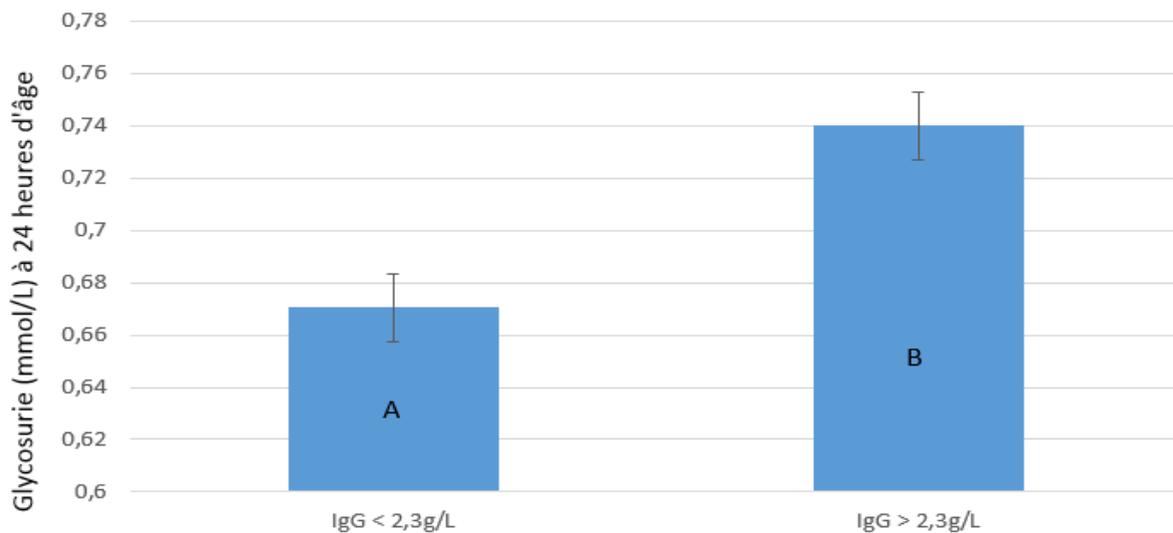


Figure 49 : Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à J1

Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$



Concentrations sériques en IgG (g/L) à 48 heures d'âge

Figure 50 : *Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycosurie (mmol/L) à J1*

Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$

- Paramètres testés à 48 heures

Parmi les paramètres testés à 48 heures, les activités sériques en PAL ($r=0,482$) et en GGT ($r=0,687$), la densité urinaire ($r=0,403$) ainsi que la croissance entre 12 et 48 heures ($r=0,595$) sont significativement corrélées avec la concentration sérique en IgG à 48 heures. La corrélation mise en évidence est faible pour la densité urinaire, elle est moyenne pour l'activité sérique des PAL, la densité urinaire et la croissance alors qu'elle est forte pour l'activité sérique des GGT. En revanche, aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la concentration sérique en IgG et la protidémie totale ($r=0,278$), la densité optique sérique ($r=0,272$), la glycémie ($r=0,280$), la protéinurie ($r=-0,050$) ainsi que le poids ($r=-0,181$; Tableau 12 ; Figures 51 à 59).

L'activité sérique des PAL et des GGT, la densité urinaire et la croissance sont significativement plus faibles chez les chiots présentant une concentration sérique en IgG inférieure à 2,3 g/L ($p < 0,001$; $p=0,000$; $p=0,028$ et $p=0,000$ respectivement ; Figures 60 à 63).

Tableau 12 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et les paramètres testés à 48 heures (n=62)

D.O : Densité optique sérique ; P.T : Concentration sérique en protéines totales ; PAL : Concentration sérique en PAL ; GGT : Concentration sérique en GGT ; D.U : Densité urinaire ; P.U : Protéinurie

* : Mise en évidence d'une corrélation significative

	Poids à 48 heures d'âge (g)	Glycémie (mg/dL)	P.U (mg/mL)	P.T (g/L)	D.O	Croissance (%)*	PAL (U/L)*	GGT (U/L)*	D.U*
Coefficient de corrélation « r »	r=-0,181	r=0,280	r=-0,050	r=0,278	r=0,272	r=0,595*	r=0,482*	r=0,687*	r=-0,403*
Probabilité « p »	p=0,212	p=0,053	p=0,731	p=0,052	p=0,062	p=0,000*	p<0,01*	p=0,000*	p=0,028*
Corrélation	Nulle	Nulle	Nulle	Nulle	Nulle	Moyenne*	Moyenne*	Forte*	Moyenne*

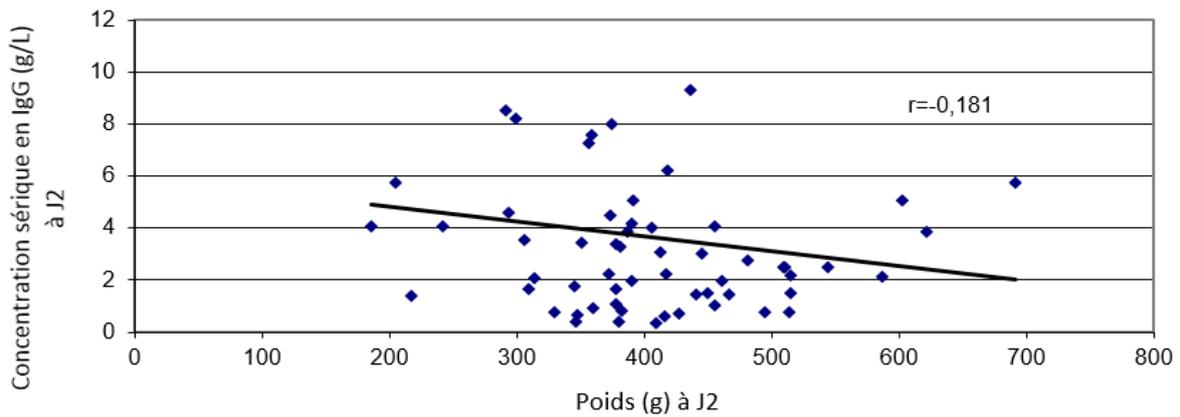


Figure 51 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le poids (g) à 48 heures (n=62)

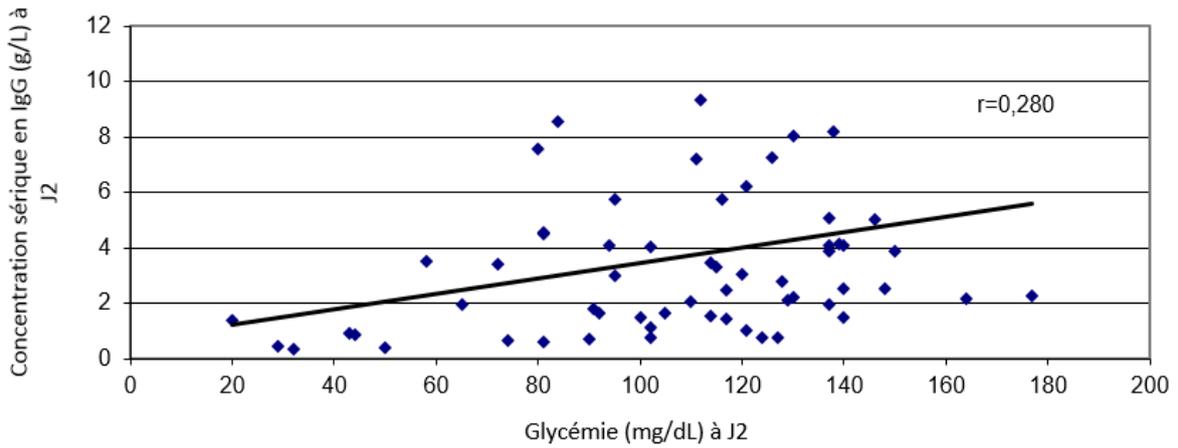


Figure 52 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la glycémie (mg/dL) à 48 heures (n=62)

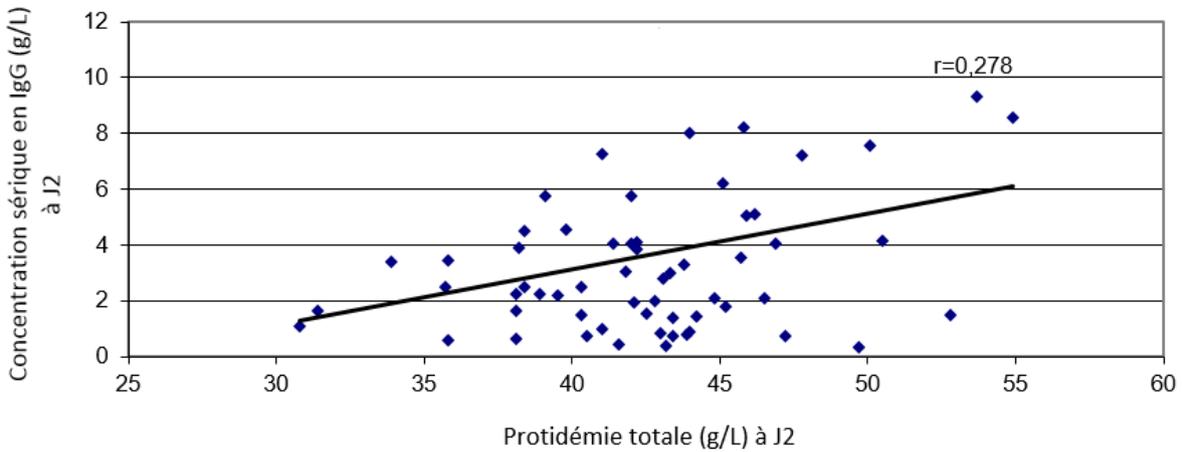


Figure 53 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la protidémie (g/L) à 48 heures (n=62)

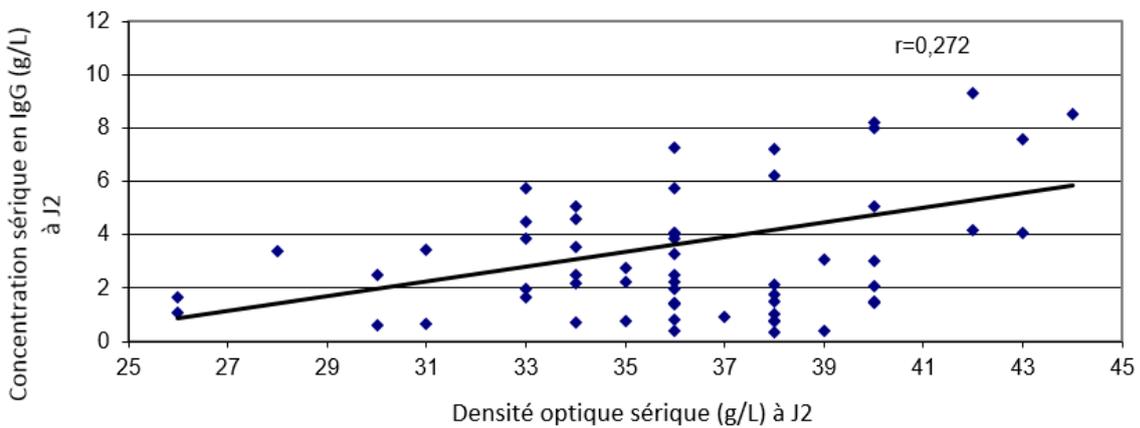


Figure 54 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité optique à 48 heures (n=62)

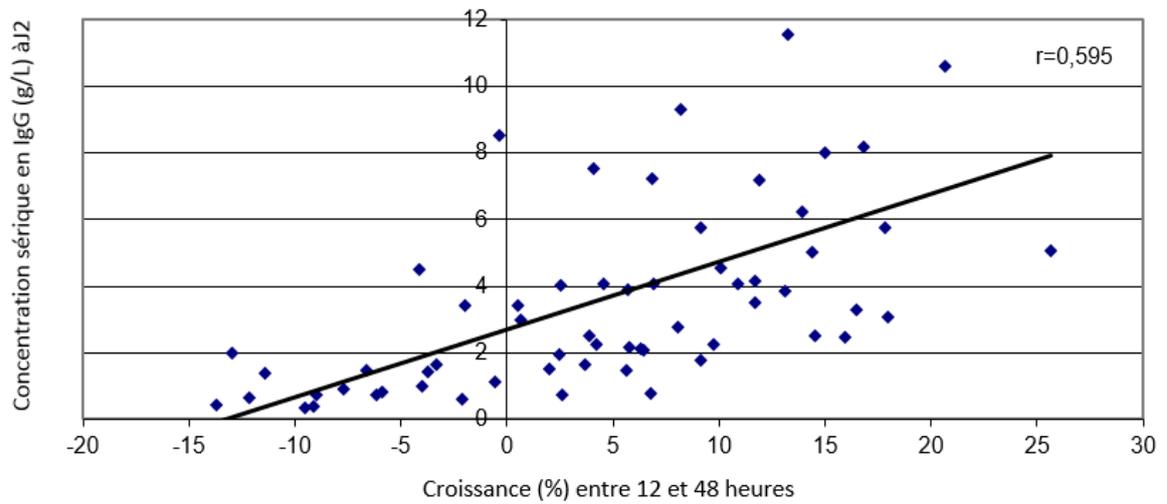


Figure 55 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le taux de croissance (%) entre 12 et 48 heures (n=62)

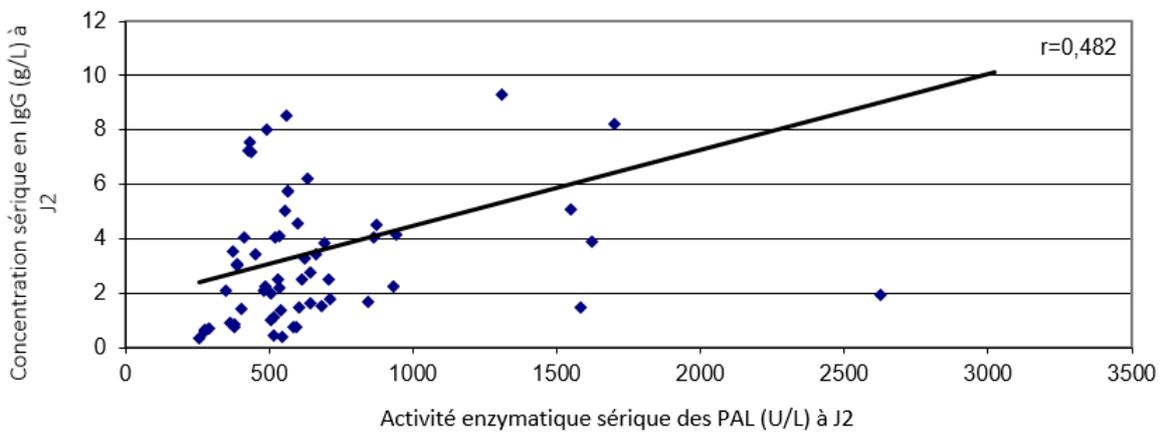


Figure 56 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des PAL (U/L) à 48 heures (n=62)

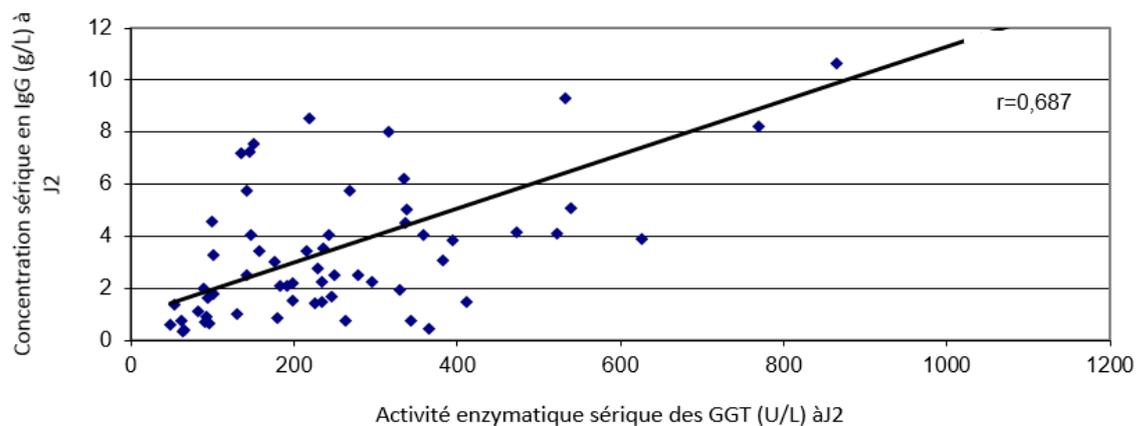


Figure 57 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des GGT (U/L) à 48 heures (n=62)

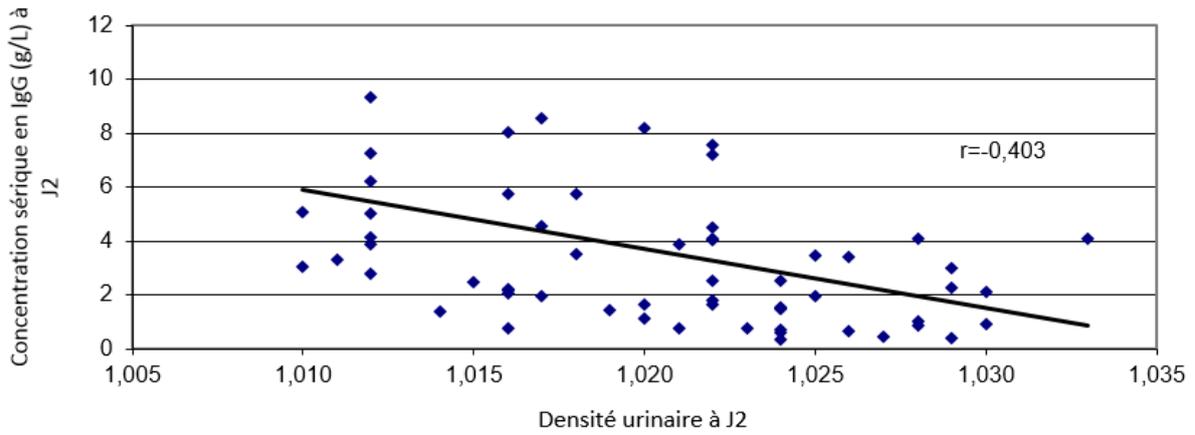


Figure 58 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la densité urinaire à 48 heures (n=62)

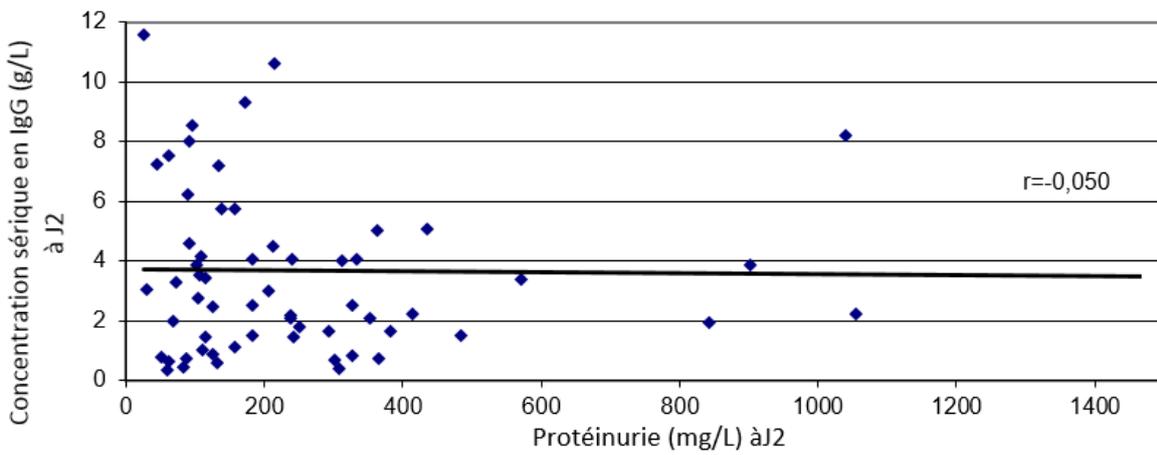


Figure 59 : Corrélation entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et la protéinurie (mg/L) à 48 heures (n=62)

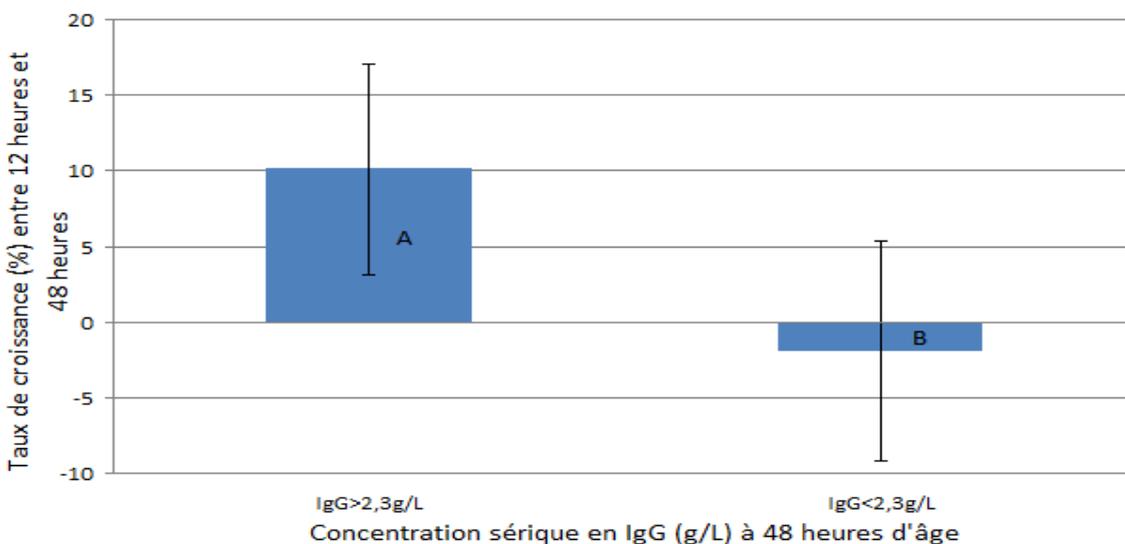


Figure 60 : Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et le taux de croissance (%) entre 12 heures et 48 heures.

Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$

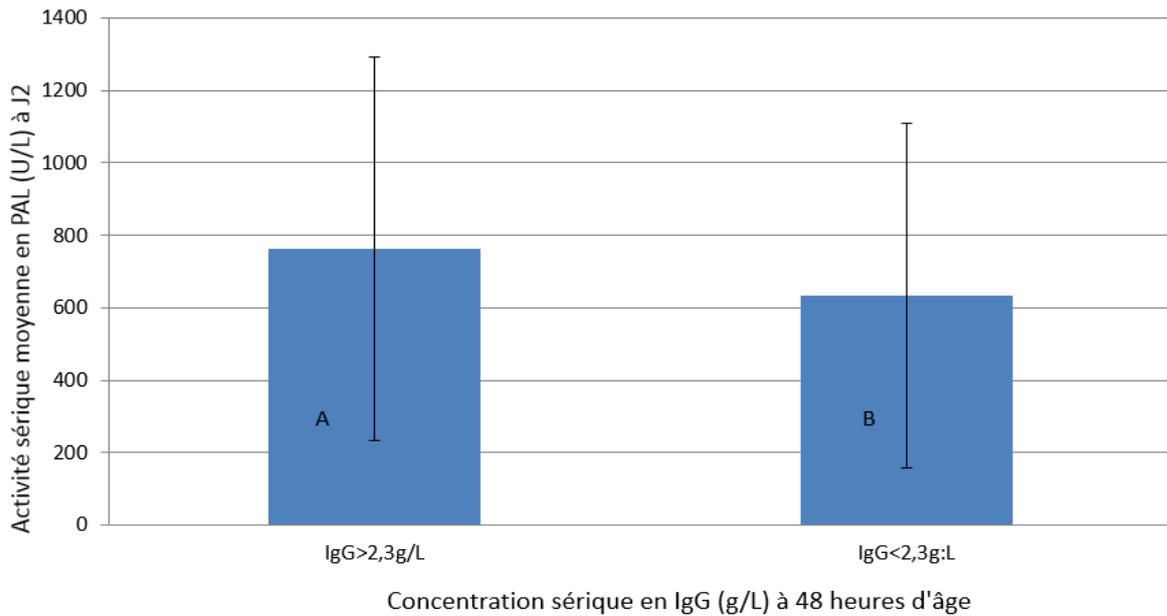


Figure 61 : *Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des PAL (U/L) à 48 heures d'âge*
Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$

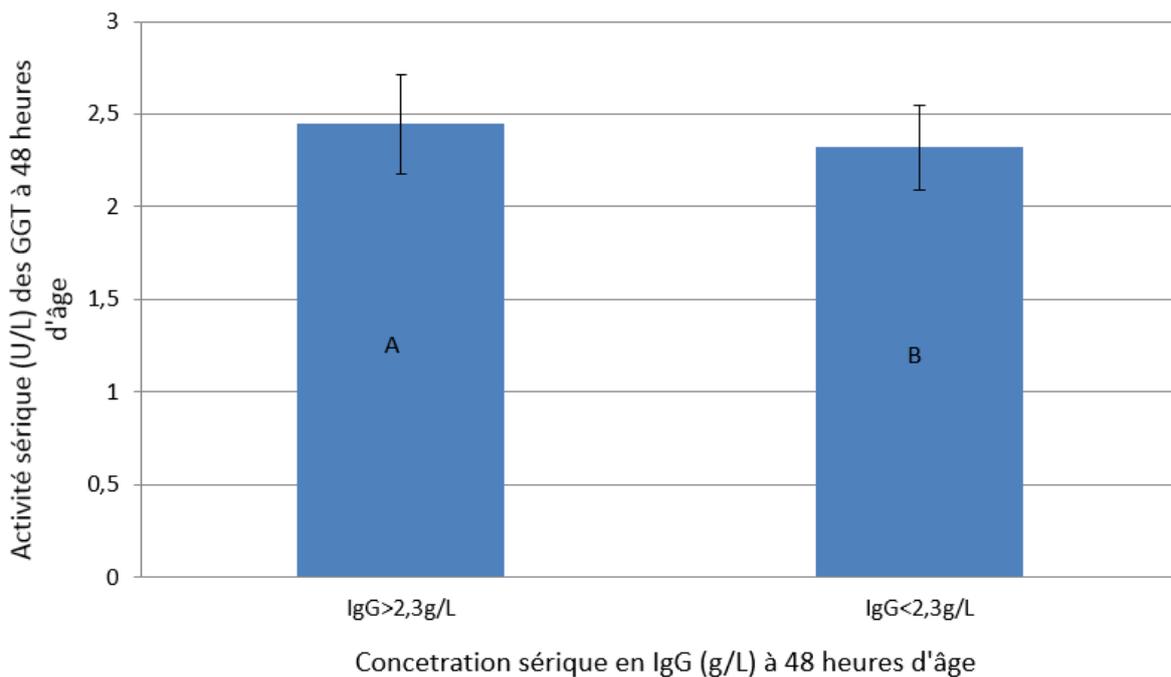


Figure 62 : *Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des GGT (U/L) à 48 heures d'âge*
Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$

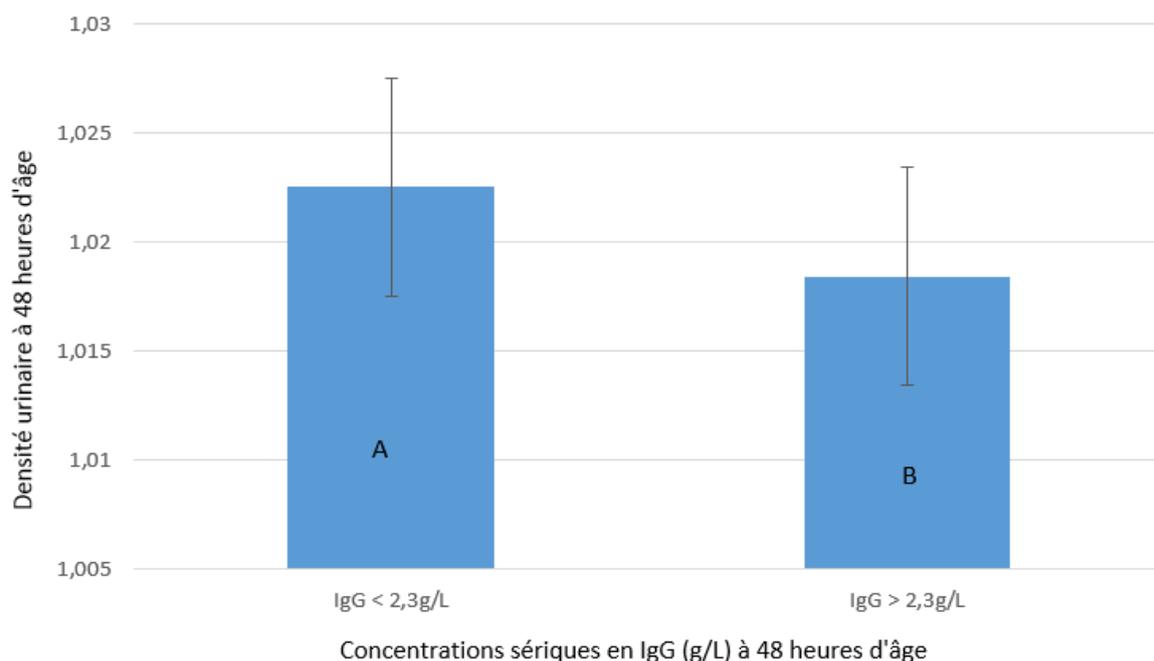


Figure 63 : Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la concentration sérique en IgG (g/L) à J2 et l'activité sérique des PAL (U/L) à 48 heures d'âge

Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$

b. Corrélations entre la glycémie à 24 heures et les différents paramètres

- Paramètres mesurés à 24 heures

Parmi les paramètres testés à 24 heures, aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la glycémie et le poids ($r=0,009$), la densité urinaire ($r=0,195$) ou encore la glycosurie ($r=0,291$). De plus, pour les trois paramètres, aucune différence significative n'a été objectivée selon que les chiots présentant ou non une glycémie inférieure à 92mg/dL (Tableau 13 ; Figure 64 à 66).

Tableau 13 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et les paramètres testés à 24 heures ($n=62$)

	Poids (g)	Densité urinaire	Glycosurie (mmol/L)
Coefficient de corrélation « r »	$r=0,009$	$r=0,195$	$r=0,291$
Probabilité « p »	$p=0,953$	$p=0,179$	$p=0,098$
Corrélation	Nulle	Nulle	Nulle

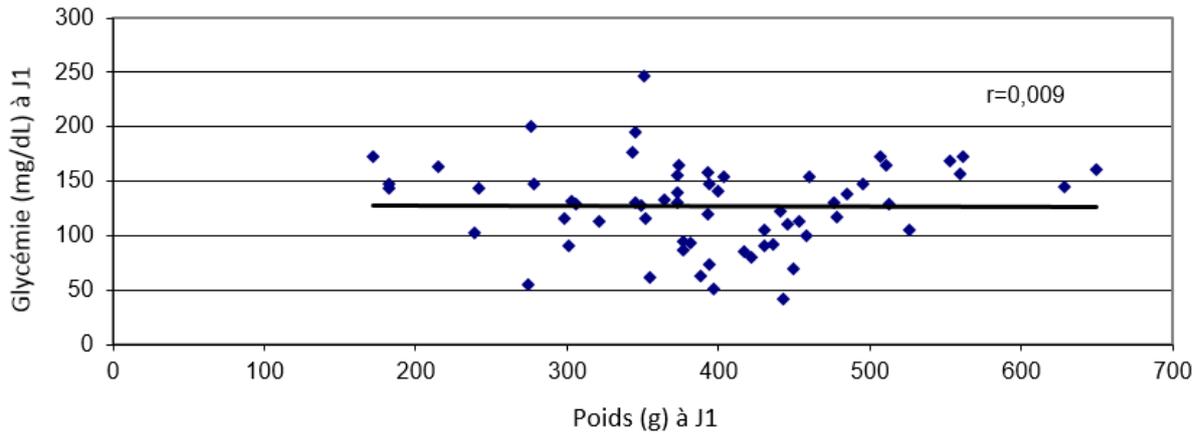


Figure 64 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et le poids (g) à J1 (n=62)

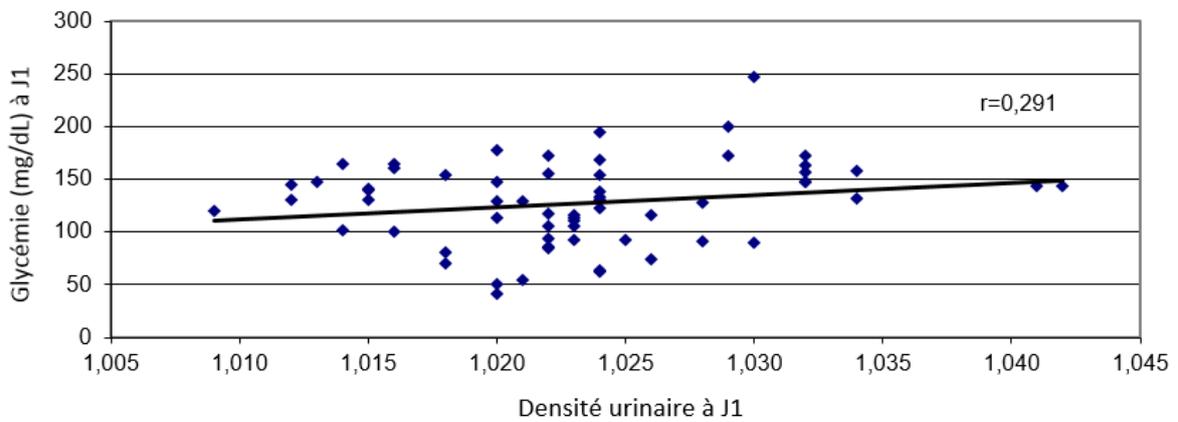


Figure 65 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et la densité urinaire à 24 heures (n=62)

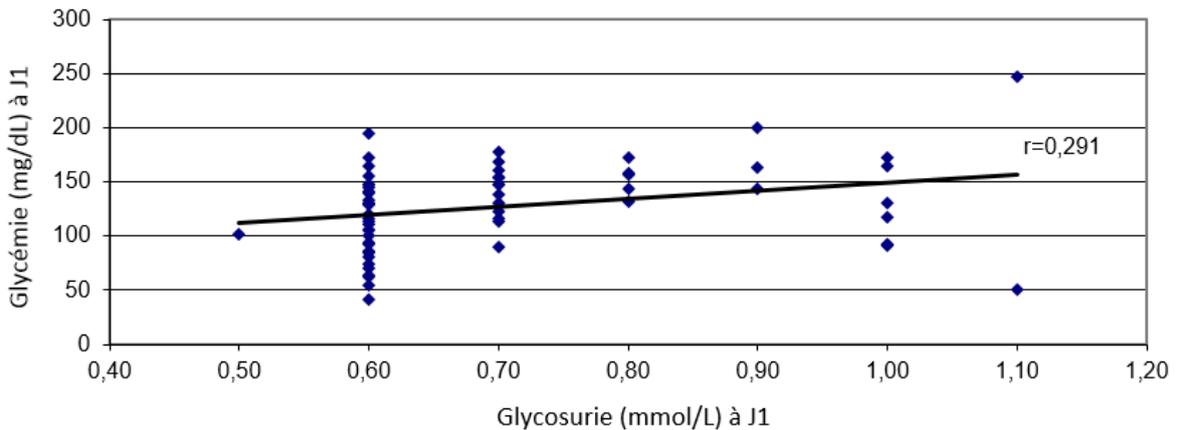


Figure 66 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et la glycosurie (mmol/L) à 24 heures (n=62)

- Paramètres mesurés à 48 heures

Parmi les paramètres testés à 48 heures, seule la croissance est liée de façon significative à la glycémie ($r=0,553$) avec une corrélation moyenne. Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la glycémie et le poids ($r=0,098$) ou entre la glycémie et la densité urinaire ($r=-0,228$; Tableau 14 ; Figure 67 à 70). La croissance est significativement plus faible ($p<0,0001$) chez les chiots dont la glycémie à 24 heures est inférieure à 92mg/dL (Figure 71).

Tableau 14 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et les paramètres testés à 48 heures (n=62)

	Poids (g)	Densité urinaire	Glycémie (mg/dL)	Croissance (%)*
Coefficient de corrélation « r »	$r=0,098$	$r=-0,228$	$r=0,146$	$r=0,553^*$
Probabilité « p »	$p=0,502$	$p=0,115$	$P=0,230$	$p=0,000^*$
Corrélation	Nulle	Nulle	Nulle	Moyenne*

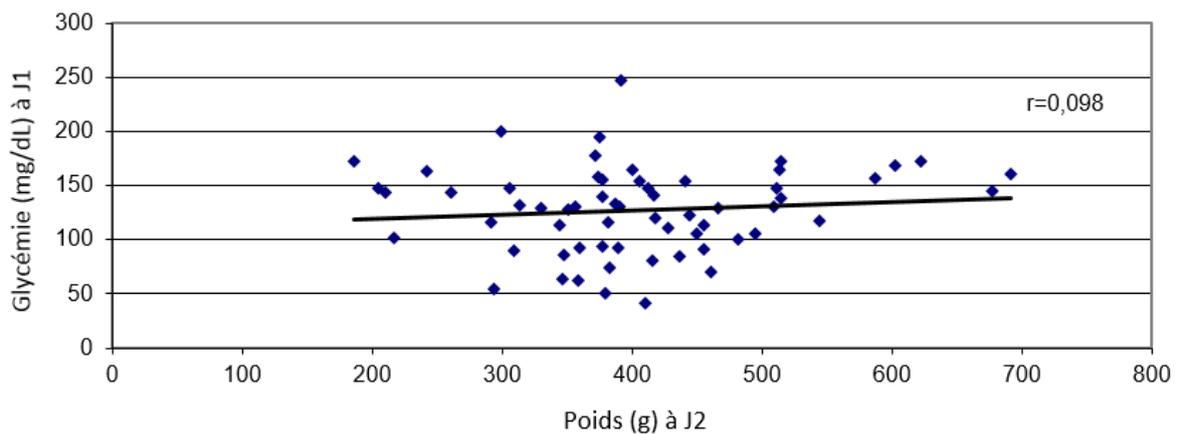


Figure 67 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et le poids (g) à 48 heures (n=62)

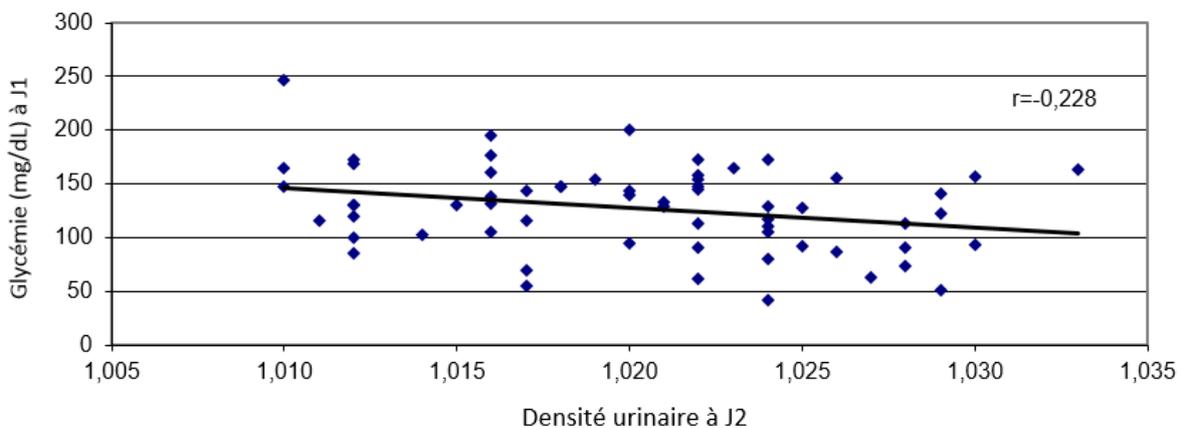


Figure 68 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et la densité urinaire à 48 heures (n=62)

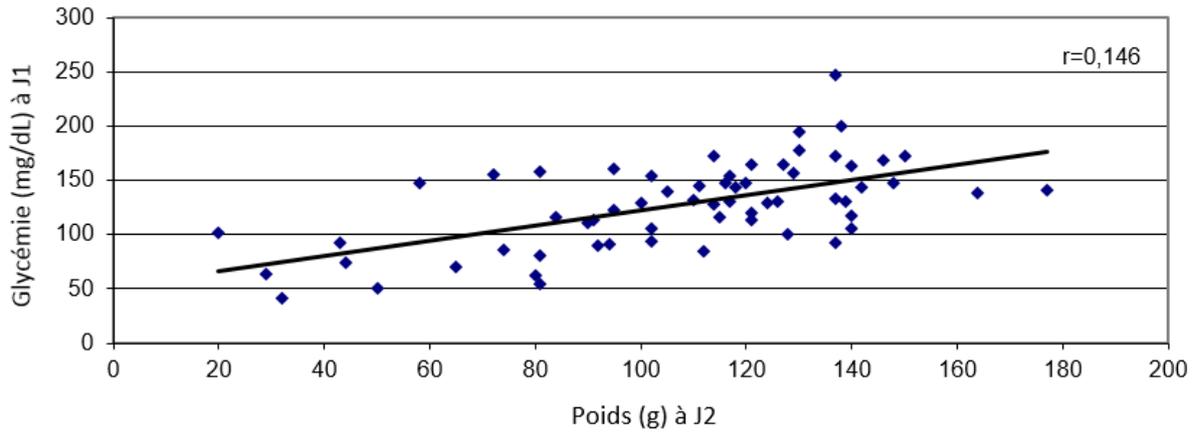


Figure 69 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et la croissance entre 12 et 48 heures (n=62)

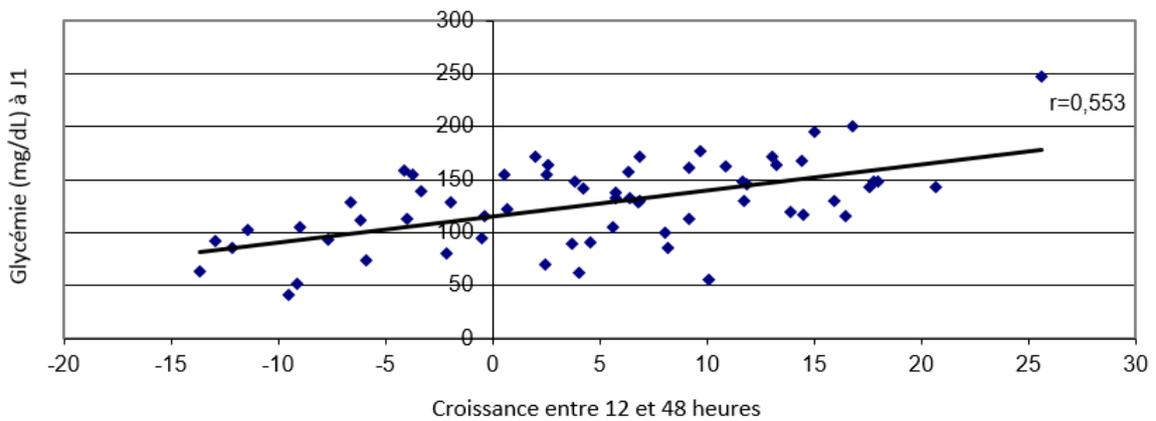


Figure 70 : Corrélation entre la glycémie (mg/dL) à J1 et le taux de croissance (%) entre 12 et 48 heures (n=62)

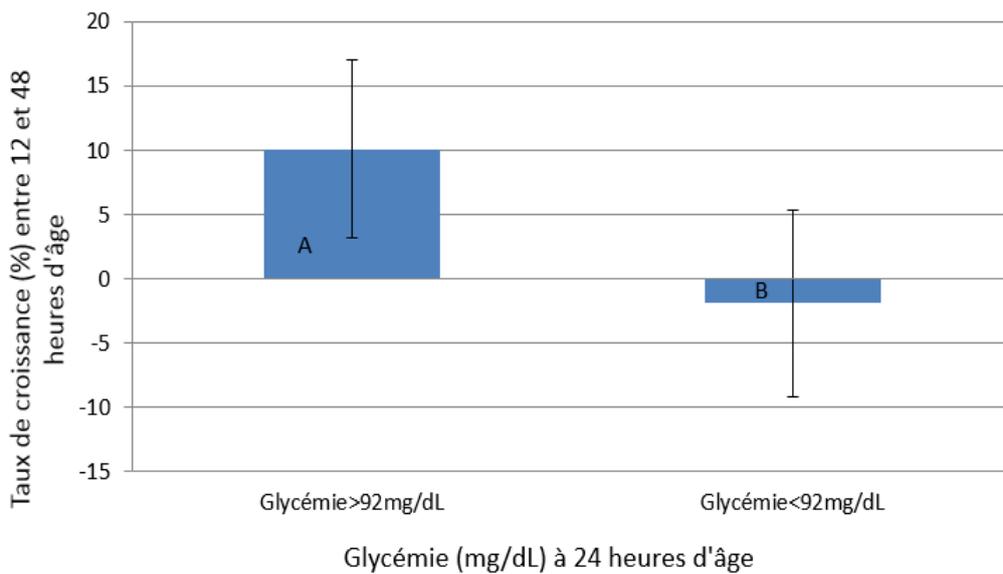


Figure 71 : Corrélation significative ($p < 0,05$) entre la glycémie (mg/dL) à J1 et le taux de croissance (%) entre 12 heures et 48 heures.

Les boîtes avec une même lettre (A ou B) n'ont pas de moyennes significativement différentes au seuil de $p < 0,05$

4. Valeur diagnostique des méthodes alternatives

a. Mesure de la concentration sérique en IgG à 48 heures

La valeur diagnostique de chaque paramètre trouvé significativement corrélé à la concentration sérique en IgG a été évaluée. Pour chaque paramètre testant la qualité du transfert passif d'immunité, une étude ROC (Receiver Operating Characteristic) est réalisée. On définit ainsi une valeur seuil en-deçà de laquelle le test traduit une concentration sérique en IgG inférieure à 2,3g/L à 48 heures, c'est-à-dire un défaut de transfert passif d'immunité. Les sensibilités et spécificités des différents outils sont respectivement comprises entre 66,7% et 88,9%, et entre 1% et 80%. La croissance et l'activité sérique des GGT présentent les deux couples (Sensibilité/Spécificité) les plus élevés. De plus, les indices de Youden de ces deux paramètres sont respectivement de 0,6 et 0,7 ce qui permet de les considérer comme des moyens fiables de détection d'un transfert passif d'immunité défectueux. A l'inverse, les indices de Youden calculés pour les autres paramètres sont tous inférieurs à 0,5 ce qui ne permet pas de les envisager comme marqueurs fiables du transfert passif d'immunité chez le chiot (Tableau 15). Les prévalences de chiots présentant un taux de croissance inférieur à la valeur seuil de -9,10% et une activité sérique des GGT inférieure à 62,0U/L sont respectivement de 79% et de 34%.

Tableau 15 : Sensibilité (%) et spécificité (%) des outils indirects de détection d'un défaut de transfert passif d'immunité (seuil de décision pour une concentration sérique en IgG inférieure à 2,3g/L)

D.U : Densité urinaire ; PAL : Activité sérique des PAL ; GGT : Activité sérique des GGT

* : Outils de bonne valeur diagnostique

		Seuil	Sensibilité (%)		Spécificité (%)		Indice de Youden
			Estimée	IC 95%	Estimée	IC 95%	
12 heures	Poids (g)	487	66,7	45,2 – 82,8	1,00	0,35 – 23,8	-0,2
	D.U	1,01	81,3	67,7 – 89,9	15,4	0,34 – 43,7	0,0
24 heures	Glycémie (mg/dL)	164	87,5	50,5 – 99,5	18,9	10,5 – 31,6	0,064
	Glycosurie (mmol/L)	0,80	84,6	56,3 – 93,6	18,8	10,1 – 32,3	0,034
48 heures	Taux de croissance (%)*	-9,10	88,9	73,3 – 95,1	71,4	35,2 – 92,1	0,6
	PAL (U/L)	714	73,3	47,5 – 89,3	15,2	0,72 – 28,6	-0,1
	GGT (U/L)*	62,0	87,5	76,0 – 94,0	80,0	35,9 – 97,5	0,7
	D.U	1,02	67,9	49,2 – 82,1	6,10	0,80 – 20,8	-0,261

b. Mesure de la glycémie à 24 heures

La valeur diagnostique de chaque paramètre trouvé significativement corrélé à la glycémie a été évaluée. Une étude ROC a été réalisée sur le taux de croissance pour définir une valeur seuil en-deçà de laquelle le test traduit une glycémie inférieure à 92 mg/dL à 24 heures, c'est-à-dire un défaut de transfert énergétique.

Cette valeur seuil de croissance est estimée à -13,7%. 4 chiots présentent une croissance inférieure à cette valeur seuil ce qui représente 6,45% de la population.

L'évaluation de la croissance des chiots entre 12 et 48 heures permet de repérer un défaut de transfert énergétique avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 10,1%. L'indice

de Youden est estimé à 0,100 ce qui ne permet pas de considérer le calcul de la croissance comme un test fiable d'estimation du transfert énergétique (Tableau 16)

Tableau 16 : Sensibilité (%) et spécificité (%) des outils indirects de détection d'un défaut de transfert énergétique (seuil de décision pour une glycémie inférieure à 92mg/dL)

	Seuil	Sensibilité (%)		Spécificité (%)		Indice de Youden
		Estimée	IC 95%	Estimée	IC 95%	
Croissance (%)	-13,7	100	90,2 - 100	10,1	5,00 – 22,1	0,100

DISCUSSION

I. Limites de l'étude

1. La population

L'étude que nous avons réalisée a été menée sur 62 chiots, sur lesquels nous avons pu conduire une analyse statistique sans que cela ne représente un échantillon véritablement conséquent. L'effectif était initialement composé de 300 chiots, mais nous n'avons donc pu inclure dans notre effectif final que 21% de cette population. 36 chiots sont morts entre la naissance et la fin des manipulations à J2 ce qui diminue l'effectif de 12%. Il a été impossible d'obtenir l'ensemble des paramètres nécessaires à la conduite de notre étude pour les 202 chiots restants. Le principal facteur limitant a été la quantité de sérum ou d'urine nécessaire aux dosages de l'ensemble des paramètres. Une quantité minimale de 300 μ L était effectivement nécessaire. 116 chiots ont ainsi été éliminés. A 24 et 48 heures, la quantité d'urines récoltée était insuffisante sur 34 et 45 chiots respectivement. Chez 37 chiots, la quantité de sérum prélevée était insuffisante pour mesurer l'ensemble des paramètres sériques à 48 heures.

Pour les 86 chiots restants, un ou deux types de prélèvement étaient manquants. Le prélèvement faisant le plus défaut était le prélèvement de sérum à J2. Chez 49 chiots, il a été impossible de prélever du sérum à 48 heures. Le prélèvement d'urines était manquant à 12, 24 et 48 heures pour 19, 10 et 8 chiots respectivement. Chez 20 chiots, aucun des trois types de prélèvement n'a été obtenu.

Cet échantillon réduit s'explique en grande partie par la difficulté à obtenir l'ensemble des prélèvements nécessaires à réalisation de notre étude sur chaque chiot né au cours de la période d'expérimentation.

De plus, la diversité de l'espèce canine est peu représentée puisque les chiots appartiennent seulement à 7 races différentes. A noter cependant que les données de la littérature portent le plus souvent sur un nombre restreint de races (Nielen *et al* (1998), une race ; Indrebo *et al* (2007), quatre races). L'étude de Tonnessen *et al* (2012), qui a rassemblé 224 races, constitue une exception notable. Il s'agit toutefois d'une étude épidémiologique analysant une base de données nationales norvégiennes et non d'une étude expérimentale.

2. Conditions environnementales

Les chiots inclus dans l'étude proviennent tous d'un même élevage et sont donc élevés dans les mêmes conditions (même bâtiment, même nourriture...). Ceci représente à la fois un avantage et un inconvénient. Effectivement, on s'affranchit ainsi des pratiques d'élevage (nourriture, manipulation des chiots...) mais il existe un risque de sélectionner des facteurs de risque propres à cet élevage. Par exemple, les pathogènes circulants sont propres à chaque élevage et conditionnent l'immunité des mères et donc le pourcentage colostral d'IgG spécifique de ce pathogène (Fox, 1963). La concentration sérique en IgG déterminée dans notre étude comme caractérisant un déficit de transfert passif d'immunité mériterait d'être vérifiée dans un autre élevage. De plus, les conditions d'élevage varient d'un élevage à l'autre, et notamment la température dans les locaux. La température influe sur les

besoins énergétiques des chiots et des mères, impactant ainsi les valeurs seuils de glycémie et de croissance précoce.

3. Echantillons

Le nombre d'échantillons de notre étude s'explique en partie par la difficulté que nous avons pu avoir à obtenir l'ensemble des prélèvements nécessaires à la réalisation de notre étude. Effectivement, pour réaliser le dosage des immunoglobulines et la mesure de la densité sérique, un prélèvement de sang à la jugulaire était nécessaire sur des chiots de deux jours d'âge. Par soucis de précision, le dosage d'IgG a été réalisé au même âge chez tous les chiots permettant de s'affranchir d'un biais liés à des variations journalières de concentrations sériques en IgG.

Concernant les mesures de glycémie, les appareils de mesure sanguine rapides ne nécessitent qu'une goutte de sang. Néanmoins pour réaliser les trois mesures, à 12, 24 et 48 heures, il était parfois compliqué d'avoir trois gouttes de sang provenant de l'oreille d'un chiot nouveau-né. Un prélèvement ponctuel reste relativement facile à réaliser pour les éleveurs. Deux personnes sont néanmoins nécessaires, une pour la contention, l'autre effectuant le prélèvement. Cet examen présente l'intérêt d'être peu invasif, peu douloureux, sans risque pour le chiot et facilement réalisable par l'éleveur. Néanmoins, un défaut de précision des appareils de mesure rapides est décrite sur des prélèvements de sang périphériques avec des glycémies faussement diminuées (Domori *et al.*, 2014). En cas de doute, un prélèvement jugulaire est recommandé ce qui enlève tout son intérêt à la mesure de glycémie. De plus, ce paramètre présente une spécificité correcte mais une sensibilité et une précision médiocres qui n'en font pas un outil de choix dans l'évaluation du statut immunitaire. Dans notre étude, les mesures de glycémie ont été réalisées à heures fixes, sans tenir compte des repas des chiots. Ainsi, un biais de mesure est probable, avec des valeurs de glycémie artificiellement basses dues à un prélèvement trop éloigné du repas sans toutefois rendre compte d'un défaut de consommation lactée.

En ce qui concerne la mesure de densité urinaire, le prélèvement n'est pas non plus traumatisant puisqu'il reproduit la sensation du chiot lorsque la mère s'occupe de lui en lui léchant la zone ano-génitale. La mesure de la densité urinaire ne nécessite que quelques gouttes d'urine, faciles à obtenir dans la grande majorité des cas. L'évaluation quantitative de la glycosurie à 24 heures n'est pas réalisable au chevet de l'animal. Dans quelques cas, il a été impossible de réaliser le prélèvement d'urine. Ceci s'explique en grande partie par la réalisation de cette étude en élevage privé et non expérimental. Il n'est donc pas envisageable d'isoler les chiots de la mère pour s'assurer la présence d'urine au moment du prélèvement. Notre étude n'a pas évalué l'efficacité des méthodes de dosage semi-quantitative par bandelette urinaire, qui sont pourtant plus faciles à réaliser pour l'éleveur et nécessitent un volume moins conséquent d'urines.

Dans notre étude, nous avons considéré le dosage des IgG sériques par test ELISA comme étant la méthode de référence à laquelle nous avons confronté l'ensemble de nos résultats. Dans la littérature, peu de données sont disponibles chez le chien, mais il est possible de confronter ce choix aux données comparatives des méthodes de dosage des IgG disponibles dans les autres espèces. Dans l'espèce bovine, la méthode d'immunodiffusion radiale de

Mancini, décrite plus haut au paragraphe A.II.1.a appliquée au IgG sériques est considérée comme le test de référence et permet de séparer les différentes classes d'IgG.

II. Résultats

1. Evaluation de la qualité du transfert d'immunité passif

a. Concentration sérique en IgG

Dans notre étude, la concentration moyenne sérique en IgG de notre population est de 3,7g/L (\pm 3,2g/L).

La quantité d'IgG fournies par la mère à ses nouveau-nés dépend à la fois de la quantité de colostrum produit, de la concentration de ce colostrum en IgG et du moment auquel le colostrum est consommé après la naissance.

L'importante variabilité constatée de la gammaglobulinémie chez le chiot met en évidence une sensibilité accrue des chiots aux pathologies infectieuses. En effet, si l'on exclut les morts-nés et les chiots atteints d'anomalies congénitales, 64 à 83% des chiots nés vivants meurent de causes infectieuses identifiées. Au total, 46 à 60% de la mortalité néonatale et pédiatrique totale est due à des causes infectieuses (Mila et Chastant-Maillard, 2014). On estime que 20% des chiots présente un défaut de transfert passif d'immunité. De plus, 60% des chiots ayant une concentration en IgG inférieure à 2,3 g/L à 48 heures survivent jusqu'à leur 50ème jour contre 94% des chiots ayant des taux en IgG supérieurs (Mila *et al.*, 2014). Dans notre population, 45% des chiots présentent une concentration sérique en IgG inférieure à ce seuil. Cette valeur est plus élevée comparativement aux données issues de précédentes études. Par exemple, Mila *et al.* (2015a), mettent en évidence 18,1% de chiots de 48 heures d'âge présentant une concentration en IgG inférieure ou égale à 2,3g/L dans un effectif de 149 chiots.

Comparativement, la mortalité chez les veaux qui bénéficient d'un transfert colostrale avant la fermeture de la barrière intestinale est de 3,9 %, alors qu'elle monte à 13,3 % si les veaux restent agammaglobulinémiques (Brignole et Stott, 1980). La morbidité et la mortalité avant le sevrage sont plus importantes chez les veaux ayant une concentration sérique en Ig inférieure à 8,0 g/L à 24 heures comparés à ceux chez qui la concentration est supérieure à 16 g/L (Perino et Sutherland, 1993). Amalric (2011) met en évidence des associations similaires entre le taux circulant d'IgG et la mortalité et la morbidité chez des agneaux durant leur période néonatale et pédiatrique. Les agneaux malades ou morts avant 40 jours d'âge avaient, en moyenne, des concentrations plasmatiques en IgG significativement inférieures ($p=0,004$) aux agneaux élevés sans symptômes avant 40 jours. Cette différence est encore plus nette si l'on compare uniquement les agneaux décédés (gammaglobulinémie moyenne de $15,65 \pm 11,27$ g/L) avec les agneaux vivants à 40 jours (gammaglobulinémie moyenne de $25,05 \pm 9,6$ g/L) ($p = 0,0008$).

Parmi les 16 paramètres testés, seuls huit (poids à 12 heures, taux de croissance précoce, densité urinaire à 24 et 48 heures, glycémie à 24 heures, glycosurie à 24h, activités enzymatiques sériques des PAL et des GGT à 48 heures) sont significativement corrélés avec la concentration sérique moyenne en IgG mesurée à 48 heures.

La mesure indirecte la mieux corrélée à celle de notre mesure de référence est l'activité enzymatique sérique des GGT ($r=0,687$). La croissance entre 12 et 48 heures ($r=0,595$) et la densité urinaire à 48 heures ($r=0,403$) sont moyennement corrélées à la gammaglobulinémie. Les corrélations des autres paramètres est faible avec un coefficient de corrélation compris 0,100 et 0,300 entre et pour l'ensemble de ces paramètres.

Si l'on confronte nos résultats aux données de la littérature, il apparaît que, dans l'espèce bovine, l'outil de mesure indirecte présentant la meilleure corrélation avec la concentration sérique en IgG est la protidémie totale. Tyler *et al.* (1996) déterminent en effet une forte corrélation ($p<0,001$ et $r=0,870$) entre la concentration sérique en IgG et la protidémie déterminée au réfractomètre optique. De même, Calloway *et al.* (2002) montrent une forte corrélation entre les concentrations sériques en IgG et en protéines ($p<0,001$ et $r=0,771$). L'étude de Perino et Sutherland (1993) compare l'utilisation du réfractomètre et la mesure des GGT chez les bovins. Elle montre une corrélation bien supérieure pour le réfractomètre optique ($r=0,87$) que pour la mesure des GGT ($r=0,64$) ce qui s'oppose aux résultats de nos travaux. Cette différence peut s'expliquer par la composition du sang qui diffère chez le chiot et chez le veau. En effet, une protidémie moyenne de 55 g/L ($\pm 7,0$ g/L) est rapportée chez ce dernier (Chigerwe *et al.*, 2015) contre 41 g/L (± 10 g/L) chez le chiot (Moon *et al.*, 2001). Après prise colostrale, la concentration moyenne en IgG chez le veau et le chiot est respectivement de 22g/L et de 18g/L (Mila et Chastant-Maillard, 2015 c). La part d'IgG dans le sérum des veau de 48 heures d'âge est donc de 40% chez le veau et de 44% chez le chiot.

b. Performance diagnostique des outils de mesure indirecte

La performance diagnostique des méthodes d'évaluation indirecte de la qualité du transfert passif d'immunité s'estime au moyen de trois paramètres que sont la sensibilité, la spécificité et le calcul de l'index de Youden.

Au seuil de 2,3g/L d'IgG les différents outils indirects bénéficient d'une sensibilité comprise entre 66,7% et 88,9% ainsi qu'une spécificité comprise entre 6,1% et 100% (Tableau 15). Les valeurs de sensibilité et spécificité sont donc extrêmement variables d'un outil à l'autre.

Aucune étude antérieure n'a porté sur les qualités intrinsèques des tests pour un seuil de détection de 2,3g/L. Les méthodes que nous avons testées sont globalement d'une spécificité médiocre, exception faite du poids à 12 heures d'âge, de la croissance précoce et de l'activité sérique des GGT à J2. La sensibilité est quant à elle variable mais assez satisfaisante. Les deux meilleurs couples « Sensibilité/Spécificité » sont obtenus avec la mesure de l'activité des GGT et la croissance avec des valeurs respectives de 87,5%/80,0% et 88,9%/71,4%.

Dans nos conditions de dépistage, un test très sensible est préféré avec comme objectif de détecter le plus grand nombre possible de chiots présentant un déficit de transfert passif d'immunité. Un test très spécifique est appréciable en seconde intention dans le but de confirmer un test de dépistage positif et de minimiser le nombre de faux positifs.

L'objectif de notre étude était de mettre en évidence des outils fiables d'estimation du statut immunitaire du chiot nouveau-né. Parmi l'ensemble des paramètres testés, la croissance entre 12 et 48 heures ainsi que l'activité sérique des GGT ressortent comme ayant les meilleures sensibilités et spécificités. De plus, ce sont les deux seuls paramètres dont l'indice de Youden est supérieur à 0,5 ce qui nous permet d'affirmer qu'il s'agit de

moyens de détection fiable d'un défaut de transfert passif d'immunité. La valeur de l'indice de Youden (Y=0,7) obtenue pour la mesure des activités sériques des GGT en fait un outil particulièrement performant pour déceler les chiots présentant un statut immunitaire déficient. A noter que l'estimation de la croissance est plus facile, rapide à utiliser et peu onéreuse pour l'éleveur en pratique puisqu'elle ne nécessite que deux pesées, à 12 et 48 heures. *A contrario*, le dosage de l'activité sérique des GGT à 48 heures impose un prélèvement sanguin bien que ce dosage soit plus simple à mettre en œuvre que celui des IgG. Dans le cas où le taux de croissance n'est pas connu, cet outil peut plus facilement être utilisé par le vétérinaire à 48 heures d'âge. Une indication du statut immunitaire du chiot peut ainsi être obtenue par une mesure ponctuelle.

En comparant nos résultats aux données de la littérature obtenues dans l'espèce bovine, il apparaît que la mesure de la concentration en protéines totales par réfractométrie optique ou numérique est la méthode indirecte d'évaluation du défaut de transfert d'immunité passive la plus performante. Pour autant le dosage des GGT apparaît utile et assez performant pour la détection des veaux présentant un statut immunitaire douteux (Tableau 17).

Tableau 17 : Performance diagnostique des outils de mesure indirecte du transfert d'immunité passif chez le veau (Données bibliographiques)

	Sources	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Indice de Youden (Y)
Réfractomètre optique (g/L)	-Vandeputte et Detilleux (2011)	100	91	0,91
	-Calloway et Tyler (2002)	89	94	0,83
	-Perino et Sutherland (1993)	80	100	0,70
Réfractomètre numérique (g/L)	-Vandeputte et Detilleux (2011)	100	93	0,93
	- Calloway et Tyler (2002)	93	80	0,73
Mesure des GGT (U/L)	-Maillard (2000)	93	92	0,85
	-Perino et Sutherland (1993)	80	97	0,77

2. Evaluation de la qualité du transfert énergétique

a. Glycémie

Dans notre étude, la glycémie moyenne des chiots est de 125 mg/dL (\pm 42,7 mg/dL). Chez le chiot, les valeurs de glycémie normales sont de 52 à 127 mg/dL (Moon *et al.*, 2001). En l'absence de prise de colostrum ou lors de prise insuffisante, une hypoglycémie sévère peut se produire dès le deuxième jour de vie. Cette hypoglycémie provoque une chute de pression artérielle de 50%, engendrant rapidement une défaillance cardiopulmonaire, responsable de la mort du nouveau-né. Les conséquences d'une hypoglycémie chez le chiot sont donc multiples avec de la léthargie, des convulsions voire une syncope lorsque la glycémie passe sous le seuil de 20 mg/dL. L'étude de Mila *et al.* (2015b) montre que 30% des chiots présentent un déficit de transfert énergétique à J1, c'est-à-dire une glycémie

inférieure à 92 mg/dL. Dans notre étude, 19% des chiots présentent un déficit de transfert énergétique à 24 heures.

Comparativement, chez le veau sain, la glycémie moyenne est estimée à 93,3 mg/dL ($\pm 18,4$ mg/dL). Dans l'espèce bovine, la glycémie des veaux est basse à la naissance : 62 mg/dL (Ruckebusch, 1984). Dans les 2 à 3 heures qui suivent la naissance, on observe une hyperglycémie chez le veau (due au stress à l'origine de la libération d'hormone hyperglycémisante). La glycémie descend ensuite progressivement tant que le veau ne s'est pas alimenté (Grongnet, 1984). Lorsque le nouveau-né s'alimente, sa glycémie s'élève à 75 mg/dL lors de l'ingestion de colostrum dans les 6 heures et 120 mg/dL lors du 2ème repas dans les 12 heures. Le taux de glucose dans le sang se stabilise autour de 100 mg/dL au bout de 24 heures. Une hypoglycémie est définie chez le veau pour des valeurs comprises entre 20 et 80 mg/dL (Michel, 1971). Des valeurs de glycémie sous ce seuil sont associées à un taux de mortalité 20 à 30% supérieur comparativement à ceux constatés chez les veaux sains (Périé, 2009).

Sur notre panel, seule la croissance entre 12 et 48 heures s'est montrée significativement corrélée ($r=0,553$) à la glycémie à 24 heures (Tableau 13). La corrélation ainsi calculée reste moyenne ($0,400 < r < 0,600$). Très peu de données sont disponibles sur les méthodes d'évaluation mini-invasives de détermination de la glycémie chez les autres espèces, et notamment chez les animaux de rente.

b. Performance diagnostique des outils de mesure indirects

Au seuil de 92 mg/dL, une croissance inférieure à -13,7% s'avère discriminante dans notre étude (Tableau 15). Si la sensibilité de cet outil est excellente (100%), sa spécificité est médiocre (10,1%). L'utilisation de la croissance comme moyen de dépistage des chiots susceptibles de présenter un défaut de transfert énergétique est envisageable. Un diagnostic de certitude ne pourrait en revanche être posé sur cette simple base et nécessiterait une confirmation par mesure de glycémie auriculaire par exemple. Néanmoins, l'index de Youden estimé à 0,1 ne permet pas de considérer la croissance précoce comme un outil diagnostique fiable d'estimation du transfert énergétique chez le chiot. De plus, ces résultats doivent être interprétés avec prudence puisque seuls 4 animaux en dessous de la valeur seuil nous permettent de conclure.

III. Perspectives d'optimisation du transfert d'immunité

L'ensemble des méthodes présentées ici permet de détecter les chiots présentant un déficit de transfert passif d'immunité après fermeture de la barrière intestinale. De ce fait, la conduite à tenir ne peut que permettre de soutenir les individus à risque mais en aucun cas d'améliorer leur statut immunitaire systémique.

Le contrôle de la qualité du colostrum semble indispensable dans la gestion du transfert passif d'immunité. Il convient d'autre part de s'assurer de la bonne prise colostrale. Le cas échéant, l'élaboration d'une colostrothèque contenant les IgG spécifiques des pathogènes rencontrés dans l'élevage permettrait d'administrer aux chiots un colostrum de qualité et ainsi de prévenir un déficit de transfert passif.

Lorsqu'il est impossible d'avoir accès à du colostrum de qualité il est possible d'administrer du plasma sanguin aux nouveau-nés. Le sérum de chien adulte (en bonne santé et correctement vacciné) peut être administré par voie orale, sous-cutanée, intra-musculaire, ou intra-péritonéale pour compenser une absence ou une insuffisance de prise colostrale. Cependant dans l'essai de Poffenbarger *et al.* (1991), l'administration de 22 mL/kg de sérum de chien adulte au nouveau-né n'a pas entraîné une augmentation significative du taux d'immunoglobulines sériques. Pour l'administration par voie orale, la période à laquelle on doit administrer le sérum est elle aussi significative car l'absorption de protéines est limitée par une fermeture intestinale précoce. On conseille de donner le sérum une heure après la naissance et d'essayer de nourrir le chiot une heure plus tard.

L'administration intra-veineuse de plasma doit être effectuée dans de futurs essais dans l'optique d'une complémentation en immunoglobulines chez le nouveau-né privé de colostrum. Le plasma doit être indemne de toute paroi cellulaire pour ne pas induire de réaction immunitaire du receveur.

Il existe un substitut de colostrum pour chiots ou chatons, disponible dans le commerce sous le nom déposé ImmunstrumND (Orsco Laboratoire vétérinaire, Neyron, France), colostrum de synthèse en poudre. D'après les données techniques de l'ImmunstrumND, il est fabriqué à partir d'un colostrum naturel bovin séché à basse température, de façon à conserver l'intégrité de ses protéines, puis il est enrichi. Il possède des ingrédients trophiques (de l'énergie, des vitamines, des facteurs de croissance), des ingrédients antimicrobiens (lactoferrine, lactoperoxydase, lysozyme, immunoglobulines). Il permettrait donc de lutter préventivement et curativement contre le syndrome de dépérissement du nouveau-né et ainsi diminuer fortement la mortalité et la morbidité liées aux diarrhées néonatales. Il apporte un panel d'immunoglobulines non spécifiques. Il serait conseillé de l'utiliser chaque fois que l'on peut craindre que la prise de colostrum de qualité par les jeunes ne puisse être garantie. La première administration doit se faire juste après la naissance, la seconde huit heures plus tard, la troisième 24 heures plus tard, puis une administration par jour est prévue jusqu'à trente jours. Après 24 heures, l'objectif est d'apporter une immunité digestive locale. Une étude (Froeschle-Charriere *et al.*, 1999) réalisée par des membres du laboratoire commercialisant l'ImmunstrumND évalue l'intérêt de l'utilisation du colostrum d'origine bovine chez les chiots nouveau-nés. Elle montre qu'au bout de quinze jours, les animaux nourris avec du colostrum sont légèrement plus lourds (d'environ 100 g) que ceux nourris avec le placebo (lait maternisé). Ils indiquent un taux de mortalité nul avec administration de colostrum contre un taux compris entre 9 et 18% dans un élevage de bergers allemands depuis 1995, mais il ne semble pas non plus y avoir de décès chez les animaux nourris avec le placebo. L'intérêt de la complémentation du chiot avec ce substitut colostrale semble donc contestable.

Dans l'espèce bovine, l'utilisation de colostro-remplaceurs est décrite et fait référence à un produit capable de fournir une quantité d'IgG suffisante, permettant au veau nouveau-né d'atteindre une concentration sérique en IgG supérieure 10 g/L. Les colostro-remplaceurs sont indiqués en remplacement du colostrum naturel maternel. L'efficacité d'absorption apparente de ces produits est extrêmement variable avec des extrêmes allant de 6 à 38% (Jones et Heinrichs, 2011). Chez de nombreux veaux recevant un supplément colostrale administré conjointement à du colostrum de mauvaise qualité, les IgG sont faiblement absorbées et ces animaux ont un échec de transfert de l'immunité passive. Plusieurs

hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène, parmi lesquelles la présence d'une grande quantité de protéines dans l'intestin en une faible période de temps au moment de l'administration du succédané : une compétition entre les IgG et les autres protéines pour l'absorption au niveau des entérocytes empêcherait une absorption efficace des immunoglobulines (Jones et Heinrichs, 2011). Une autre explication serait liée à l'absence de cellules immunitaires, et/ou à la faible quantité d'énergie, de vitamines et d'oligo-éléments contenus dans les suppléments colostraux.

Franceschini (1950) a pensé conduire un allaitement artificiel de chiots avec du colostrum bovin. Celui-ci est deux fois plus riche en matières protéiques que le lait normal de chienne. Il contient en outre plus de sels minéraux, plus de lipides, de manganèse, de zinc et jusqu'à 100 fois plus de vitamines A, B et E. Sa teneur en lactose est faible, les matières grasses bien qu'excédentaires, n'atteignent pas le taux du lait de chienne. Cet inconvénient reste mineur car il est toujours facile d'en ajouter. Le colostrum bovin représente donc un substitut intéressant au colostrum de chienne, comme substitut nutritionnel. Cependant l'intérêt immunitaire reste à démontrer (Jonquieres, 1961).

L'optimisation de la prise colostrale doit s'articuler autour de trois grands axes que sont la gestion de la mère, la gestion du nouveau-né et la gestion du colostrum lui-même (Figure 62).

Conclusion

Le colostrum est un véritable lien entre la mère et le chiot après la mise bas permettant le développement de l'immunité du jeune et sa survie. La qualité de ce transfert d'immunité passive a un impact sur la mortalité et donc sur les performances des élevages canins.

Notre étude, basée sur 62 chiots âgés de 12 à 48 heures, visait à évaluer les performances diagnostiques d'outils mini-invasifs pouvant évaluer la qualité du colostrum et du transfert d'immunité passive dans le cadre d'une utilisation en routine par l'éleveur.

Différents outils peuvent être utilisés pour évaluer la qualité du transfert passif d'immunité. Pour l'éleveur, la mesure du taux de croissance entre 12 et 48 heures d'âge s'avère être un moyen rapide, facile à mettre en œuvre, peu onéreux et fiable pour détecter les chiots au statut immunitaire défaillant. Le manque de spécificité de cet outil n'en fait pas un outil parfaitement fiable. Il peut être intéressant de confronter ce résultat à un dosage de l'activité sérique des GGT à 48 heures d'âge. Ce dernier examen peut aisément être réalisé par le vétérinaire sur tout analyseur biochimique et montre une meilleure valeur diagnostique que le taux de croissance.

Pour ce qui est de l'estimation du transfert énergétique, les faibles sensibilités obtenues dans nos résultats ne permettent effectivement pas d'envisager ces outils comme moyens de détection fiables des chiots à risque accru de mortalité secondaire à un défaut de transfert énergétique.

Malgré tout, l'utilisation de ces outils suggère un bénéfice important par leur faible coût et la rapidité des outils indirects rendent ces méthodes intéressantes pour l'éleveur. Il serait intéressant d'étudier l'impact économique d'une telle surveillance de la prise colostrale à l'aide de ces outils pour une amélioration de la survie des chiots.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Sylvie CHASTANT, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **MANTELLI Morgane** intitulée « **Mise au point de méthodes mini-invasives d'évaluation du transfert d'immunité et du transfert énergétique chez le chiot de moins de 48 heures.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

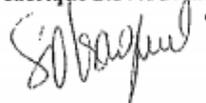


Fait à Toulouse, le 14 octobre 2016
Professeure Sylvie CHASTANT
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN

Vu :
Le Président du jury :
Professeure Frédérique SAVAGNER



Melle MANTELLI Morgane
a été admis(e) sur concours en : 2011
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015
a validé son année d'approfondissement le : 08/09/2016
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL.

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT



Université
de Toulouse

BIBLIOGRAPHIE

ADKINS Y., LEPINE A. J., LÖNNERDAL B., 2001. Changes in protein and nutrient composition of milk throughout lactation in dogs. *J Am Vet Research*. Vol. 62, n° 8, p. 1266-1272

ALBARET A., MILA H., GRELLET A., CHASTANT-MAILLARD S., 2016. Pattern of immunoglobulin G concentration in canine colostrum and milk during the lactation. In : *ISCFR VIII International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. 22-25 juin 2016., Maisons-Alfort., p. 93

AMALRIC S (2011). Variabilité de la concentration en immunoglobulines G du colostrum de brebis et conséquences sur la survie précoce de l'agneau, Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse

ARNOLD M.A., SMALL G.W., 2005. Noninvasive glucose sensing. *Anal Chem.*, Vol. 77. p.5429-5439

ASCHINBERG L. C., GOLDSMITH D. I., OLBING H., SPITZER A., EDELMANN C. M., BLAUFOX M. D., 1975. Neonatal changes in renal blood flow distribution in puppies. *J Am Vet Research*. Vol. 228, n° 5, p. 1453-1461

BEARDSALL K., OGILVY-STUART A., AHLUWALIA J., THOMPSON M., DUNGER D., 2005. The continuous glucose monitoring sensor in neonatal intensive care. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. Vol. 90, n° 4, p. F307-F310

BELIN M (2013). Croissance et mortalité du chiot en élevage, Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse

BESSON C., VERWAERDE P., BRET-BENNIS L., PRIYMENKO N., 2005, L'évaluation clinique de l'état nutritionnel chez les carnivores domestiques. *Revue Méd. Vét.* Vol 156. p. 269-274

BETH M. JOHNSON, MICKAEL M. FRY, BENTE FLATLAND, CLAUDIA A. KIRK. 2009. Comparison of a human portable blood glucose meter, veterinary portable blood glucose meter, and automated chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentrations in dogs. In : *J Am Vet Med Assoc*. Vol 235. p.1309-1313

BIELMANN V., GILLAN J., PERKINS N.R., SKIDMORE A.L., GODDEN S., LESLIE K.E., 2010. An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle, *J. Dairy Sci*. Vol 93. p.3713-3721

BOVEE, K. C., JEZYK, P. F. et SEGAL, S. C., 1984. Postnatal development of renal tubular amino acid reabsorption in canine pups. *J Am Vet Research*. Vol. 45, p. 830-832

BRAUN J. P., TAINURIER D., LAUGIER C., BENARD P., THOUVENOT J.P., 1982. Early variations of blood plasma gamma-glutamyl transferase in newborn calves - a test of colostrum intake. *J. Dairy Sci*. Vol. 65, p.2178-2181

BRIGNOLE T.J., STOTT G.H., 1980. Effect of suckling followed by bottle feeding colostrum on immunoglobulin absorption and calf survival. *J Dairy Sci.* Vol. 63, p.451-456

BURRIN J.M., PRICE C.P., 1985. Measurement of blood glucose. *Ann Clin Biochem.* Vol 4., p.327-342

CALLOWAY C. D., TYLER J.W., 2002. Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *J Am Vet Med Assoc.* Vol 221. p.1605-1608

CATTEAU M (2014). Température du chiot en période néonatale et pédiatrique : mesure, variation, intérêt pronostique, Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse

CENTER S. A., RANDOLPH J. F., MANWARREN T., SLATER M., 1991. Effect of colostrum ingestion on gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase activities in neonatal pups. *J Am Vet Research.* Vol. 52. n° 3, p. 499-504

CHASTANT-MAILLARD S., FREYBURGER L., MARCHETEAU E., THOUMIRE S., RAVIER JF., REYNAUDK., 2012. Timing of the intestinal barrier closure in puppies. *Repro Dom Anim.* Vol 47. n°6, p 190-193

CHOLEAU C., REACH G., 2003. Mesure en continu de la glycémie : différents sites, différentes ambitions. *Diabete Metab.* Vol 29. n°2, p 15-20

CHIGERWE M., HAGEY J., SHARIF S., 2015., Determination of neonatal serum immunoglobulin G concentrations associated with mortality during the first 4 months of life in dairy heifer calves. *J D R.* Vol 82. n°4, p 400-406

CRIGHTON, G. W., 1968. Symposium: Neonatal Diseases of the Dog: III: Thermal Regulation in the New-born Dog. *J Small Anim Pract.* Vol. 9, n° 9, p. 463-472

DESHPANDE S., WARD PLATT M., 2005. The investigation and management of neonatal hypoglycaemia. *Semin Fetal Neonatal Med.* Vol. 10, n° 4, p. 351-361

DEVERY J. E., DAVIS C. L., LARSON B. L., 1979. Endogenous production of immunoglobulin IgG1 in newborn calves. *J Dairy Sci.* Vol. 62, n° 11, p. 1814-1818

DEVERY-POCIUS, J. E., LARSON, B. L., 1983. Age and previous lactations as factors in the amount of bovine colostrum immunoglobulins. *J Dairy Sc.* Vol. 66, n° 2, p. 221-226

DOMORI A., SUNAHARA A., TATENO M., MIYAMA T.S, SETOGUCHI A., ENDO Y., 2014. The clinical utility of two human portable blood glucose meters in canine and feline practice. *Vet Clinical Path.* Vol. 43, n° 1, p. 55-62

DONOVAN, G. A., DOHOO, I. R., MONTGOMERY, D. M. et BENNETT, F. L., 1998. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. *Prev Vet Med.* Vol. 34, n° 1, p. 31-46

- FERRANTE DO AMARAL C., WOLF B., 2008. Current development in non-invasive glucose monitoring. In : *Med Engineering & Phy.* Vol. 30, n° 5, p. 541-549
- ENEJDER A., SCECINA T., JEANKUN O., HUNTER M., SHIH W., SASIC S., HOROWITZ G., FELD M., 2005. Raman spectroscopy for noninvasive glucose measurements. *J Biomed Op.* Vol.10. p. 10-13
- FORBAT, L. N., COLLINS, R. E., MASKELL, G. K. et SÖNKSEN, P. H., 1981. Glucose concentrations in parotid fluid and venous blood of patients attending a diabetic clinic. *J R Soc Med.* Vol. 74, n° 10, p. 725-728
- FOX M. W., 1963. Neonatal mortality in the dog. *JSAP.* Vol. 143, p. 1219-1223.
- FRANCESCHINI G. (1950) Contribution à l'étude du lait de chienne. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de Médecine de Créteil.
- FROESCHLE-CHARRIERE C., VULLIERME JC., SOURNAC D., 1999. Intérêt de l'utilisation de colostrum d'origine bovine chez les chiots nouveaux-nés. *Présentation orale, Programme scientifique du Congrès Mondial Vétérinaire*, Lyon. 23 au 26 septembre 1999. p. 21-24
- GERMAN A. J., HALL E. J., DAY M. J., 1998. Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. *Vet Immunol Immunopathol.* Vol. 64, n° 2, p. 107-121
- GODDEN S.M., HAINES D.M., HAGMAN D., 2009. Improving passive transfer of immunoglobulins. *J. Dairy Sci.*, Vol 92, p.1750-1757
- GRONGNET J., 1984. Conséquences métaboliques de l'hypoxie chez le veau et l'agneau nouveau-nés. *Jarrige R. et INRA (eds), 14ème Journées du Grenier de Theix. Physiologie et pathologie périnatale chez les animaux de ferme*, Paris : INRA, p. 203- 214
- GRUNDY S.A., 2006. Clinically Relevant Physiology of the Neonate. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* Vol. 36, n° 3, p. 443-459
- GUY M. A., MCFADDEN T. B., COCKRELL D. C., BESSER T. E., 1994. Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. *Journal of Dairy Science.* Vol. 77, n° 10, p. 3002-3007
- GYURE W., 1977, Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin Chem.* Vol 23. n°5, p. 876-879
- HAY D. A., EVAN A. P., 1979. Maturation of the proximal tubule in the puppy kidney: a comparison to the adult. *The Anatomical Record.* Vol. 195, n° 2, p. 273-299
- HEDDLE R. J., ROWLEY D., 1975. Dog immunoglobulins. I. immunochemical characterization of dog serum, parotid saliva, colostrum, milk and small bowel fluid. *Immunology.* Vol. 29, n° 1, p. 185-195.

HEINRICH J., JONES C., 2011. Review of recent research investigating effects of calf feeding program on first Lactation on performance. *Pennsylvania State University bulletin*. Vol. 29, n°3, p.172

HERPIN P., DAMON M., LE DIVIDICH J., 2002. Development of thermoregulation and neonatal survival in pigs. *Livestock Production Science*. Vol. 78, n° 1, p. 25-45

HORSTER M., VALTIN H., 1971. Postnatal development of renal function: micropuncture and clearance studies in the dog. *JCI*. Vol. 50, n° 4, p. 779-795

HUSBAND A.J., LASCELLES A.K., 1975. Antibody responses to neonatal immunization in calves, *Res. Vet. Sci.*, Vol 18, p.201-207

INDREBØ A., TRANGERUD C., MOE L., 2007. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Vet Scand*. Vol. 49, n° 1, p. 1-5

JOHNSON B.M., FRY., FLATLAND, BENTE, KIRK C.A, 2009. Comparison of a human portable blood glucose meter, veterinary portable blood glucose meter, and automated chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentrations in dogs. *JAVMA*. Vol. 235, n° 11, p. 1309-1313

JONQUERES (1961). L'allaitement artificiel du chiot. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine de Créteil

KHALIL O.S., YEH S.J, LOWERY M.G., WU X., HANNA C.F., KANTOR S., JENG T., KANGER J., BOLT R.A., DE MUL., 2003. Temperature modulation of the visible and near infrared absorption and scattering coefficients of human skin. *J Biomed Opt*. Vol. 8, n° 2, p. 191-205

KICKHOFEN D.K., WESTPHAL M., 1971. Occurrence of IgG fragments in the urine of the newborn calf. *Eur J Immunol*. Vol 1, n°1, p.49-54

KLEINMAN L.I., REUTER J.H., 1973. Maturation of glomerular blood flow distribution in the new-born dog. *J Physiol*. Vol. 228, n° 1, p. 91-103

KLIEGMAN R. M., MIETTINEN E. L., ADAM P. A., 1981. Fetal and neonatal responses to maternal canine starvation: circulating fuels and neonatal glucose production. *Pediatr Res*. Vol. 15, n° 6, p. 945-951

KLIEGMAN R. M., MORTON S., 1987. The metabolic response of the canine neonate to twenty-four hours of fasting. *Metabolism*. Vol. 36, n° 6, p. 521-526

KLONOFF D.C., 1997. Review : Noninvasive Blood Glucose Monitoring. *Diab care*. Vol. 20, n°3, p.433-437

LANE I.F., DARCY M.S., SHAW H., SHELLEY S., BURTON A., DONALD W., 2000, Quantitative urinalysis in healthy Beagle puppies from 9 to 27 weeks of age, *AJVR*., Vol 61., n°5., p.577-581

LE BRICON T., ERLICH D., DUSSAUCY M., GARNIER JP., BOUSQUET B., 1998. Dosage des protéines urinaires totales. Etude comparative des techniques automatisées à l'acide trichloracétique et au rouge de pyrogallol pour les échantillons contenant des chaînes légères monoclonales. *Ann Biol Clin*. Vol 56, n°6. p. 711-715

LE DIVIDICH J., ROOKE J.A., HERPIN P., 2005. Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. *JAS*, Vol. 143, n°6, p. 469-485

LEFEVRE G., BLOCH S., LE BRICON T., BILLIER S., ARIEN S., CAPEAU J., Influence of protein composition on total urinary protein determined by pyrocatechol-violet (UPRO Vitros) and pyrogallol red dye binding methods. *J Clin Lab Anal* 2001. Vol 15, p.40-42

LEVIEUX D., 1991, Dosage des IgG du lait de vache par immunodiffusion radiale semi-automatisée, pour la détection du colostrum, des laits de mammites ou de fin de gestation. *INRA Editions*, Vol 71, p.327-338

MALCHOFF C.D., SHOUKRI K., LANDAU J.I., BUCHERT J.M., 2002. A novel noninvasive blood glucose monitor. *Diab Care*. Vol. 25, n° 12, p. 2268-2275

MAILLARD R., 2000. Immunité, diarrhée, vaccination, *XVe journal technique des GTV*, Bourgogne, Autin, p.5-19

MAILLARD R., 2006. Le transfert de l'immunité colostrale chez le veau, *Point Vétérinaire, N° Spécial Reproduction des Ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum*, Vol 37. p.110 – 114

MCGUIRE T. C., PFEIFFER N. E., WEIKEL J. M., BARTSCH R. C., 1976. Failure of colostral immunoglobulin transfer in calves dying from infectious disease. *JAVMA*. Vol. 169, n° 7, p. 713-718

MC GUIRK M., COLLINS C., 2004. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. Vol. 20, n° 3, p. 593-603

MEHROTRA K., CHAWLA, T. N., KUMAR A., 1968. Correlation of salivary sugar with blood sugar. *Contemp Clin Dent*. Vol. 40, n° 10, p. 265-269.

MICHEL M.C., 1971, Profils biochimiques chez le veau sain ou diarrhéique., *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*. Vol. 2., p.303-304.

MILA, H., FEUGIER, A., GRELLET, A., ANNE, J., GONNIER, M., MARTIN, M., ROSSIG, L. et CHASTANT-MAILLARD, S., 2014. Inadequate passive immune transfer in puppies: definition, risk factors and prevention in a large multi-breed kennel. *Prev Vet Med*. Vol. 116, n° 1-2, p. 209-213.

MILA H., CHASTANT-MAILLARD S., 2015a. Neonatal period in domestic animals and human – crucial steps for survival. *PLOS Biology*.

MILA H., GRELLET A., FEUGIER A., CHASTANT-MAILLARD S., 2015b. Differential impact of birth weight and early growth on neonatal mortality in puppies. *J Anim Sci*. Vol. 93, n° 9, p. 4436-4442

MILA H., FEUGIER A., GRELLET A., ANNE J., GONNIER M., MARTIN M., ROSSIG L., CHASTANT-MAILLARD S., 2015c Immunoglobulin G concentration in canine colostrum : evaluation and variability. *J Reprod Immunol*. Vol. 112. p.24-28

MOON F. P., MASSAT B.J., PASCOE P.J., 2001. Neonatal critical care. *Vet Clin north Am [Small Anim Pract]*. Vol 31. p. 343-367

MÜNNICH A., 2008. The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. *Vet Research Com*. Vol. 32. n°1, p.81-85

NAYLOR J.M., KRONEFELD D.S., 1977. Refractometry as a measure of the immunoglobulin status of the newborn dairy calf: comparison with the zinc sulphate turbidity test and single radial immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res.*, Vol 38. n°9, p.1331-1334

NIELEN A. L., VAN DER GAAG I., KNOL B. W., SCHUKKEN, Y. H., 1998. Investigation of mortality and pathological changes in a 14-month birth cohort of boxer puppies. *Vet Rec*. Vol. 142, n° 22, p. 602-606

NORCROSS NL., 1982, Secretion and composition of colostrum and milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. Vol 181., p.1057-1060

OLBING H., BLAUFOX M. D., ASCHINBERG L. C., SILKALNS G. I., BERNSTEIN J., SPITZER A., EDELMANN C. M., 1973. Postnatal changes in renal glomerular blood flow distribution in puppies. *J Clin Invest*. Vol. 52, n° 11, p. 2885-2895

OSBORNE C.A., STEVENS J.B., 1999. Chapitre 7 : faire "parler" davantage les analyses urinaires : optimiser les résultats des examens reproductibles. In : *Analyses urinaires : guide clinique*. Leverkusen : Bayer Editions. p. 51-63.

PAGAN, J.D., 2005. Managing growth for different commercial end points. *Advances in Equine Nutrition III ed Kentucky Equine Research*, Vol. 3, p. 319-326

PARIS N., OUEDRAOGO G., 1992. Intérêt de la gamma-glutamyl transférase sérique et de la protidémie totale pour le contrôle de la prise colostrale chez les veaux nouveaux-nés. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, Vol. 168, p.43-47

PERIE A., 2009., Les examens complémentaires utilisables au chevet du veau nouveau-né. *Dépêche vét.*, (1048), p.16

PERINO L. J., SUTHERLAND R. L. 1993. Serum gamma-glutamyltransferase activity and protein concentration at birth and after suckling in calves with adequate and inadequate passive transfer of immunoglobulin G. *Am J Vet Research*, Vol 54. p.56-59

PITZER R., DESAI S., DUNN T., EDELMAN S., JAYALAKSHMI Y., KENNEDY J., TAMADA J.A., POTTS R.O., 2001. Detection of Hypoglycemia With the GlucoWatch Biographer. *Diab Care*. Vol. 24, n° 5, p. 881-885

POFFENBARGER E. M., OLSON P. N., CHANDLER M. L., SEIM H. B., VARMAN M., 1991. Use of adult dog serum as a substitute for colostrum in the neonatal dog. *Ame J VetbResearch*. Vol. 52, n° 8, p. 1221-1224

POTTS R.O., TAMADA J.A., TIERNEY M.J., 2002, Glucose monitoring by reverse iontophoresis. *Diabetes Metabolism Res Rev*. Vol 18. p.549-553

SCHAFFER-SOMI S., BÄR-SCHADLER S., AURICH JE., 2005. Immunoglobulins in nasal secretions of dog puppies from birth to six weeks of age. *Res Vet Sci*, Vol. 78. p.143-150

RAVARY B., SATTLER N., ROCH N., 2006. Néonatalogie du veau. Edition du Point Vétérinaire. Partie I, page 39.

REBRIN M.D., GARRY M., 2000. Can Interstitial Glucose Assessment Replace Blood Glucose Measurements? *Diabetes technol ther*. Vol. 2, n°3, p. 461-472

REINEKE E.L., FLETCHER D.J., KING L.G., 2010. Accuracy of a continuous glucose monitoring system in dogs and cats with diabetic ketoacidosis. *J Vet Emerg Crit Care*, Vol.20. p.303-312

RICKARD V., 2011. Birth and the first 24 hours. *Small Animal Pediatrics : the first 12 months of life*. 1st edition. Saint Louis : Saunders/Elsevier. p. 11-19.

ROMDHANE B., KHIARI D., MAKRAM J., ROMDANE M.N., LOUZIR H., M'BAZAA A., 2001. Estimation of colostrum immunity transfer in newborn calves through determination of GGT and protein levels in serum. *Rev. Méd. Vét*. Vol.7, p.627-632

RUCKEBUSH Y., 1984. Homéostasie foetale et autonomie néo-natale. *Jarrige R. et INRA (eds), 14ème Journées du Grenier de Theix. Physiologie et pathologie périnatale chez les animaux de ferme*, Paris : INRA, pp. 95-114

SHANNON J.A., FISHER S., 1938, The tubular reabsorption of glucose in the normal dog. *Am J Physiol*. Vol 122. p.765-774.

SURMAN S., FLEEMAN L., 2013. Continuous glucose monitoring in small animals. *Vet Clin North Am*. Vol. 43, n° 2, p. 381-406.

TØNNESSEN R., BORGE K., NØDTVEDT A., INDREBØ A., 2012. Canine perinatal mortality: A cohort study of 224 breeds. *Theriogenology*. Vol. 77, n° 9, p. 1788-1801

TYLER J.W., HANCOCK D.D., PARISH S.M., REA D.E., BESSER T.E., SANDERS S.G., WILSON L.K., 1996., Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves. *J Vet Intern Med.*, Vol.10. p.304-304

VANDEPUTTE S., DETILLEUX J., 2001. Comparison of four refractometers for the investigation of the passive transfer in beef calves. *J Vet Intern Med*, Vol.25. p.1465- 1469

VAN DER BEEK S., NIELEN A. L., SCHUKKEN Y. H., BRASCAMP E. W., 1999. Evaluation of genetic, common-litter, and within-litter effects on preweaning mortality in a birth cohort of puppies. *Am J Vet Res*. Vol. 60, n° 9, p. 1106-1110

VOLDOIRE E. (2002) Physiologie et pathologie néonatales du chiot de moins de quinze jours. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.

WEAVER D. M., TYLER J. W., VANMETRE D. C., HOSTETLER D. E., BARRINGTON G. M., 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *JVIM*. Vol. 14, n° 6, p. 569-577

WIEDMEYER C.E., DeCLUE A.E., 2008, Continuous Glucose Monitoring in Dogs and Cats. *JVIM*. Vol 22. p.1-8

YAMAGUCHI M., MITSUMORI M., KANO Y., 1998. Noninvasively measuring blood glucose using saliva. *IEEE eng med biol mag*. Vol. 17, n° 3, p. 59-63

YEH S., HANNA C., KHALIL O., Monitoring Blood Glucose Changes in Cutaneous Tissue by Temperature-modulated Localized Reflectance Measurements. *Clin Chem*. Vol. 49.

NOM : MANTELLI

PRENOM : Morgane

TITRE : Mise au point de méthodes mini-invasives d'évaluation du transfert d'immunité et du transfert énergétique chez le chiot de moins de 48 heures.

RESUME : Le taux de mortalité néonatale en élevage canin atteint 15 à 20% ce qui représente une perte économique importante. Un défaut de transfert passif d'immunité et/ou un défaut de transfert énergétique expliquent en partie ce résultat. La quantification de ces deux paramètres sur le terrain est complexe et invasive. A l'aide de données récupérées dans un élevage français d'octobre à novembre 2014 sur 62 chiots nous avons testé la corrélation entre neuf paramètres obtenus de façon non invasive et la concentration d'immunoglobulines sériques à J2 ainsi que la corrélation entre cinq paramètres et la glycémie à J1. Le paramètre le plus fiable pour détecter une concentration en IgG inférieure à 2,3g/L à J2 est l'activité sérique des GGT à J2 (sensibilité=87,5% ; spécificité = 80,0% ; Index de Youden = 0,7) avec une valeur seuil de 62,0 U/L. Seul le taux de croissance entre 12 et 18 heures est significativement corrélé à la glycémie à J1. Ce paramètre n'est toutefois pas un outil fiable de détection des chiots avec une glycémie inférieure à 92mg/dL à J1 (sensibilité = 100% ; spécificité = 10,1% ; Index de Youden = 0,1). Ce travail offre des perspectives nouvelles dans l'évaluation du statut immunitaire du chiot avec pour objectif de repérer les chiots à risque et de diminuer la mortalité en élevage canin.

MOTS-CLES : élevage canin/ chiot/ immunoglobulines/ glycémie/ GGT/ taux de croissance

ENGLISH TITLE: Development of non-invasive methods of determining the immune status and the energy transfer in puppies less than 48 hours.

ABSTRACT: Neonatal mortality rate in canine breedings reaches 15-20% which represents a significant economic loss. This might be the result of a failure of passive immunity transfer and/or a failure of energy transfer. Estimation of these parameters is difficult to achieve in the field. With data collected in a French canine breeding from October to November 2015 (62 puppies), we checked the correlation between nine non-invasive parameters and the serum concentration of IgG at Day 2. We checked the correlation between five parameters and the glycaemia at Day 1. The most reliable parameter to detect a serum concentration of IgG below 2.3g/L is the GGT serum activity at Day 2 (sensitivity=87.5%; specificity=80.0%; Youden Index=0.7) with a threshold value of 62.0 U/L. In cattle, this parameter is already used as a proxy for immunity transfer. The only parameter that is significantly correlated with glycaemia at Day 1 is the growth rate between 12 and 48 hours. However, this parameter is not reliable to detect a glycaemia below 92 mg/dL (sensitivity=100%; specificity=10.1% ; Youden Index=0.1). This study is offering new perspectives in evaluation of the immune status. Our goal is to reduce the mortality in canine breedings.

KEYWORDS: canine breeding / puppy/ immunoglobulins/ glycaemia/ GGT/ growth rate