



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 : 17453

To cite this version :

Semat, Julie. *Mise en place d'une méthode de diagnostic moléculaire par PCR quantitative pour détecter et identifier les microfilaires sanguines de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* chez le chien*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 180 p.

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

MISE EN PLACE D'UNE MÉTHODE DE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE PAR PCR QUANTITATIVE POUR DÉTECTER ET IDENTIFIER LES MICROFILAIRES SANGUINES DE DIROFILARIA IMMITIS ET DE DIROFILARIA REPENS CHEZ LE CHIEN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

SEMAT, Julie

Née, le 23/04/1992 à Thiais (94)

Directeur de thèse : M. Philippe JACQUIET

JURY

PRESIDENT :

M. Antoine BERRY

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Philippe JACQUIET
M. Emmanuel LIENARD

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

MEMBRE INVITE :

Mme Christelle GRISEZ

Ingénieur de Recherche 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/SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE	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. PICALET 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 Hélène, 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

À notre président de jury, Monsieur le Professeur Antoine BERRY

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil

Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur Philippe JACQUIET

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie et Maladies Parasitaires

Pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse,

Pour m'avoir encadrée et accompagnée dans ce travail

Pour votre patience et votre grande disponibilité,

Mes remerciements les plus sincères.

À Monsieur le Docteur Emmanuel LIENARD

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie et Maladies Parasitaires

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse

Merci pour votre implication et vos nombreux conseils,

Sincère reconnaissance.

À Madame Christelle GRISEZ

Ingénieur de recherche INRA-ENVT

Laboratoire de Parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour m'avoir enseigné les bases du travail de laboratoire,

Merci pour votre patience, votre flexibilité

Et votre investissement dans mon travail de thèse.

À Madame le Docteur Armelle DIQUELOU

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Médecine Interne

Pour son aimable collaboration et son aide précieuse,

Tous mes remerciements.

À Madame le Docteur Christelle CAMUS

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Biologie et Génétique Moléculaires

Pour ses conseils avisés,

Tous mes remerciements

À Monsieur le Docteur Fabrice CONCHOU

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Service d'Imagerie médicale

Sincères remerciements.

À Madame le Docteur Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie

Sincères remerciements.

Au Professeur Domenico OTRANTO de l'Université de Bari en Italie,

Pour nous avoir fait parvenir l'ADN nécessaire pour initier nos manipulations,

Sincère reconnaissance.

Aux Docteurs Angela IONICA et Loredana POP de la Faculté de médecine vétérinaire de Cluj-Napoca en Roumanie

Pour nous avoir envoyé les filaires,

Sincères remerciements.

À Madame Françoise PREVOT

Assistante ingénieur au laboratoire de Parasitologie de l'ENVT

Pour m'avoir encadré pour une partie des manipulations au laboratoire,

Un grand merci.

À l'ESCAPP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites)

Pour l'intérêt porté à mon projet de thèse et leur indispensable contribution,
Sincère reconnaissance.

À tous les vétérinaires qui ont participé de près ou de loin à mon travail de thèse,

Au Docteur RAMSAMY sur l'île de la Réunion, ainsi qu'aux Docteurs THOMAS et MELOT,

Au Docteur FRANTZ en Nouvelle-Calédonie et aux Docteurs LESEIGNEUR et LAMAGNERE,

Au Docteur IBENE en Guadeloupe,

Au Docteur GREMION, vétérinaire du refuge de Flayosc, et à Julie, l'ASV avec qui j'ai pu réaliser les prélèvements sur place,

À la Clinique Vétérinaire du Vernet et aux Docteurs CHARRU, MAMOUHDI et ZAHRA pour avoir pensé à moi quand l'occasion s'est présentée.

Pour avoir accepté de participer à ce travail de thèse,
Pour avoir eu la patience et le courage de réaliser les prélèvements,
Sans vous, ce travail n'aurait pu être mené à bien.
Sincères remerciements à tous.

À l'ensemble de mes proches,

Pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix et m'avoir permis de réaliser mes rêves,
Merci infiniment.

Table des matières

Table des matières	1
Table des annexes.....	6
Table des figures	7
Table des tableaux	11
Introduction	13
Partie 1 : Étude bibliographique : La dirofilariose canine à <i>Dirofilaria immitis</i> et les autres filarioses du chien	15
I. Les espèces de filaires parasites du chien.....	16
1) Classification systématique des filaires du chien	16
2) Répartition géographique	18
a) Répartition géographique des filarioses canines	18
b) Répartition géographique des cas zoonotiques liés aux filaires du chien.....	20
3) Morphologie des filaires adultes et des microfilaires	22
a) Morphologie des vers adultes.....	22
b) Morphologie des microfilaires (larves L1).....	24
4) Biologie et cycle évolutif.....	27
a) <i>Dirofilaria immitis</i>	27
i. Hôtes définitifs	27
ii. Hôtes intermédiaires	29
iii. Transmission des larves L3 infestantes à l'hôte définitif	32
iv. Schéma récapitulatif du cycle de <i>Dirofilaria immitis</i> chez le chien.....	33
b) <i>Dirofilaria repens</i>	34
c) <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	35
d) <i>Acanthocheilonema dracunculoïdes</i>	37
e) <i>Cercopithifilaria spp.</i>	37
f) <i>Onchocerca lupi</i>	38
5) La bactérie <i>Wolbachia pipientis</i> , symbiote des filaires	40
a) Présentation générale.....	40
b) Symbiose entre les bactéries et les filaires	40
c) <i>Wolbachia</i> et <i>Dirofilaria immitis</i>	40
6) <i>Dirofilaria immitis</i> , agent de la dirofilariose cardio-pulmonaire.....	42
a) Épidémiologie de la dirofilariose canine à <i>Dirofilaria immitis</i>	42
b) Pathogénie de la dirofilariose cardio-pulmonaire.....	45

i.	Pathogénie de la forme chronique classique de la dirofilariose cardio-pulmonaire ..	45
ii.	Pathogénie du Syndrome de la Veine Cave.....	49
iii.	Pathogénie de la forme occulte liée à la destruction immunologique des microfilaires	49
c)	Étude clinique chez le chien	51
i.	Forme classique = Forme chronique cardio-pulmonaire	51
ii.	Formes aiguës.....	53
iii.	Forme occulte liée à la destruction immunologique des microfilaires	55
iv.	Formes atypiques.....	55
d)	Éléments d'orientation de biologie clinique	57
i.	Lors de forme classique de la dirofilariose.....	57
ii.	Lors de Syndrome de la Veine Cave	58
e)	Anomalies des images radiographiques, échocardiographiques et de l'électrocardiogramme lors de dirofilariose cardio-pulmonaire	59
i.	Les images radiographiques thoraciques lors de dirofilariose.....	59
ii.	Les images échocardiographiques lors de dirofilariose	61
iii.	L'électrocardiographie (ECG).....	62
f)	Potentiel zoonotique de <i>Dirofilaria immitis</i>	63
7)	Pouvoir pathogène de <i>Dirofilaria repens</i> et des autres filaires parasites du chien.....	64
a)	<i>Dirofilaria repens</i>	64
b)	<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	66
c)	<i>Acanthocheilonema dracunculoïdes</i>	66
d)	Genre <i>Cercopithifilaria</i>	67
e)	<i>Onchocerca lupi</i>	68
II.	Diagnostic expérimental des filarioses canines	71
1)	Mise en évidence et identification des microfilaires	71
a)	Mise en évidence des microfilaires sanguines.....	71
b)	Identification de l'espèce de microfilaires.....	73
c)	Limites des méthodes de détection des microfilaires sanguines	76
d)	Mise en évidence des microfilaires dermatropes	79
2)	Mise en évidence d'antigènes circulants de <i>Dirofilaria immitis</i>	80
a)	Principe des tests sérologiques	80
b)	Les différents tests sérologiques disponibles.....	82
c)	Intérêts et limites des tests de détection des antigènes circulants.....	83
3)	Méthodes de diagnostic moléculaire	84
4)	Recommandations actuelles pour optimiser le diagnostic.....	85

III.	Traitement et prévention de la dirofilariose canine	86
1)	Traitement de la dirofilariose canine à <i>Dirofilaria immitis</i>	86
a)	Traitement médical	86
i.	Evaluation préalable au traitement	86
ii.	Traitement adulticide	87
iii.	Traitement microfilaricide	90
iv.	Traitements adjuvants	92
v.	Traitement de la thromboembolie pulmonaire	93
b)	Traitement chirurgical	94
i.	Syndrome de la Veine Cave	94
ii.	Localisation oculaire	95
c)	Recommandations actuelles en termes de traitement	96
2)	Prophylaxie de la dirofilariose canine	98
a)	Mesures sanitaires et chimiques pour éviter l'infestation	98
b)	Mesures médicales de chimioprévention	99
c)	La résistance aux lactones macrocycliques	101
3)	Traitement et prévention des autres filarioses canines	103
a)	<i>Dirofilaria repens</i>	103
i.	Traitement de la dirofilariose sous-cutanée à <i>Dirofilaria repens</i>	103
ii.	Prévention de la dirofilariose sous-cutanée à <i>Dirofilaria repens</i>	104
b)	<i>Acanthocheilonema reconditum</i> et <i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	105
c)	<i>Cercopithifilaria</i> spp.	105
d)	<i>Onchocerca lupi</i>	105

Partie 2 : Partie expérimentale : Mise en place d'une méthode de diagnostic moléculaire par PCR quantitative pour détecter et identifier les microfilaries sanguines de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* chez le chien..... 107

I.	Objectifs de l'étude expérimentale	108
II.	Matériels et méthodes	109
1)	Recrutement des chiens et modalités de prélèvements	109
a)	Principes de recrutement des chiens	109
b)	Modalités de recrutement des chiens	110
c)	Profil des chiens inclus dans l'étude	111
d)	Modalités de prélèvement	112
e)	Conservation et envoi des échantillons	112
2)	Méthodes diagnostiques	113
a)	Recherche des microfilaries avec la méthode par filtration	113

b)	Test rapide de détection des antigènes solubles de <i>Dirofilaria immitis</i>	114
c)	PCR quantitative duplex	115
i.	Extraction de l'ADN	115
ii.	Principe de la PCR en temps réel avec la méthode EvaGreen®	116
iii.	Témoins positifs et Témoin négatif	119
iv.	ADN Matrice et amorces de la qPCR	120
v.	Protocole pour la PCR en temps réel	121
III.	Résultats de l'étude expérimentale	125
1)	Résultats du Filarassay® et du Snap 4DX® IDEXX	125
2)	Résultats de la PCR en temps réel	128
a)	Expériences préliminaires	128
i.	Mise en place à l'ENVT du protocole de PCR quantitative décrit par Latrofa et al. en 2012 avec les extraits d'ADN de <i>Dirofilaria immitis</i> et de <i>Dirofilaria repens</i> provenant d'Italie	128
ii.	Nouveaux témoins positifs obtenus à partir de filaires adultes de Roumanie	129
iii.	Résultats des qPCR simplex sur les témoins positifs et séquençage des séquences amplifiées	130
b)	Résultats de la qPCR pour la recherche d'ADN des microfilaires sanguines sur les chiens prélevés dans l'étude	131
i.	Pour les chiens de France métropolitaine	131
ii.	Pour les chiens des DOM-TOM	134
3)	Synthèse des résultats	136
a)	Pour les chiens de France métropolitaine	136
b)	Pour les chiens des DOM-TOM	137
c)	Tableau Bilan	138
d)	Étude statistique	139
IV.	Discussion	141
1)	Population canine étudiée et prélèvements	141
a)	Choix des chiens prélevés	141
b)	Modalités du prélèvement	141
c)	Conservation du sang total sur EDTA	142
d)	Transport des prélèvements	142
2)	Méthode de concentration pour détecter les microfilaires	143
a)	Choix de la méthode	143
b)	Limites de la méthode	143
3)	Test de détection des antigènes de <i>Dirofilaria immitis</i>	144
a)	Choix du test rapide	144

b) Limites de l'interprétation	144
4) PCR en temps réel	145
a) Choix des amorces.....	145
b) Choix des témoins positifs.....	145
c) Sensibilité de la PCR en temps réel.....	145
i. Nécessité d'une dilution au 1/10 ^{ème} de l'extrait d'ADN.....	145
ii. Sensibilité de la qPCR par rapport au test Filarassay®.....	147
iii. Sensibilité de la qPCR par rapport au Snap 4DX®.....	147
d) Spécificité de la PCR en temps réel.....	148
i. Amplifications non spécifiques	148
ii. Spécificité de la qPCR comparée aux autres tests	148
5) Interprétation des résultats.....	149
Conclusion.....	152
Bibliographie.....	154
Annexes	167

Table des annexes

Annexe 1 : Fiche de consentement éclairé et Fiche d'accompagnement des prélèvements	168
Annexe 2 : Taux de réponse et de participation des vétérinaires contactés	170
Annexe 3 : Liste des chiens inclus dans l'étude et résultats des différents tests	171
Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN avec le kit QIAGEN « QIAamp®DNA Mini Kit ».....	176
Annexe 5 : Résultats des PCR en temps réel réalisées.....	177
Annexe 6 : Purification du produit d'amplification de PCR avec le Kit d'extraction d'ADN « QIAquick PCR Purification Kit Ref 2810 ».....	178

Table des figures

Figure 1 : Classification taxonomique des principales espèces de filaires parasites du chien	17
Figure 2 : Distribution géographique actuelle des parasites <i>Dirofilaria immitis</i> et <i>Dirofilaria repens</i> d'après Simón et al, 2012	18
Figure 3 : Zones approximatives d'enzootie de <i>Dirofilaria immitis</i> (à gauche) et <i>Dirofilaria repens</i> (à droite) en Europe d'après Otranto et al. 2013	19
Figure 4 : Distribution d' <i>Acanthocheilonema reconditum</i> , <i>Cercopithifilaria spp.</i> et <i>Onchocerca lupi</i> en Europe d'après Otranto et al. 2013.....	20
Figure 5 : Distribution actuelle des cas de dirofilariose humaine liée à <i>Dirofilaria immitis</i> et à <i>Dirofilaria repens</i> d'après Simón et al. 2012.....	21
Figure 6 : Schéma de filaires adultes mâle et femelle de <i>Dirofilaria immitis</i> (Raillet Alcide, 1895) ...	22
Figure 7 : Vers adultes d' <i>Onchocerca lupi</i> au sein d'une masse rétro-bulbaire d'un chien.....	23
Figure 8 : Coupe histologique d'un nodule sous conjonctival montrant les caractéristiques de la cuticule de la femelle d' <i>Onchocerca lupi</i> avec les arêtes (flèches) et les stries (triangles).....	23
Figure 9 : Extrémités antérieures et postérieures des microfilaires de <i>Dirofilaria immitis</i> (A-B) et <i>Dirofilaria repens</i> (C-D) D'après Traversa et al. 2010	24
Figure 10 : Observations de microfilaires d' <i>Acanthocheilonema reconditum</i> au microscope photonique (A) Microfilarie entière ; (B) Extrémité caudale en crochet ; (C) Corps interne D'après Napoli et al. 2014 & Rodríguez García 1990.....	24
Figure 11 : Taille moyenne des microfilaires évaluée après fixation avec la technique de Knott modifié sur 377 chiens D'après Magnis et al. 2013.....	25
Figure 12 : Schéma représentant une microfilarie de l'espèce <i>Cercopithifilaria sp.II</i> en vue latérale et en vue dorso-ventrale, d'après Otranto et al. 2011.....	25
Figure 13: Observation microscopique de microfilaires de : (A) <i>Cercopithifilaria sp. II</i> ; (B) <i>Cercopithifilaria bainae</i> ; (C) <i>Cercopithifilaria grassii</i> D'après Cortes et al. 2014	26
Figure 14 : Microfilarie cutanée d' <i>Onchocerca lupi</i> observée au microscope électronique. D'après Otranto et al. 2013	26
Figure 15 : Photographie de filaires adultes de <i>Dirofilaria immitis</i> dans le cœur droit d'un chien	28
Figure 16 : Modélisation de l'extrémité antérieure d'une filaire adulte de <i>Dirofilaria immitis</i> Source : Curtis. 2015	28
Figure 17 : <i>Culex pipiens pipiens</i> (à gauche) et <i>Aedes albopictus</i> (à droite)	29
Figure 18 : Schéma d'un moustique absorbant des microfilaires au cours du repas sanguin et photographie de la trompe d'un moustique contenant une larve L3 (Sources : P. Bourdeau, ONIRIS)	31
Figure 19 : Nombre de générations potentielles de <i>Dirofilaria immitis</i> chez les moustiques vecteurs en une année d'après Genchi et al. 2009	31
Figure 20 : Représentation schématique du cycle de <i>Dirofilaria immitis</i> élaborée d'après un schéma issu de l'article de Genchi et al. 2013.....	33
Figure 21 : Représentation schématique du cycle de <i>Dirofilaria repens</i> élaborée d'après un schéma issu de l'article de Genchi et al. 2013.....	35
Figure 22 : Coupes histologiques d'une puce infestée par <i>A. reconditum</i> colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.....	36

Figure 23 : (A) Coupe histologique du derme où des microfilaries (indiquées par les flèches) ont été détectées par biopsie cutanée; (B) (C) (D) Larves de <i>Cercopithifilaria sp.II</i> provenant de tiques disséquées (B) Stade L1, (C) Stade L2, (D) Stade L3 D'après Otranto et al. 2012	38
Figure 24 : Photographies de <i>Simulium reptans</i> (à gauche) et d'un <i>Culicoïde</i> (à droite) Crédit Illustration : Google Images	39
Figure 25 : Mise en évidence de protéines de surface de <i>Wolbachia</i> (WSP) par immuno-histochimie	41
Figure 26 : Cartes indiquant le nombre moyen de cas de dirofilariose à <i>Dirofilaria immitis</i> recensés par clinique vétérinaire aux Etats-Unis en 2001 et en 2013, d'après le site web de l'American Heartworm Society (AHS)	42
Figure 27 : Répartition géographique des cas de dirofilariose cardio-pulmonaire des carnivores en France d'après Bourdeau et al. 2008	44
Figure 28 : Représentation schématique de la physiopathologie de la dirofilariose cardio-pulmonaire	46
Figure 29 : Altérations pathologiques des artères pulmonaires associées à la dirofilariose cardio-pulmonaire.....	47
Figure 30 : Comparaison d'une coupe histologique d'un glomérule normal et d'un glomérule avec glomérulonéphrite à immuns complexes (d'après Cours ENVT – Immunologie A2).....	48
Figure 31 : Forme oculaire de la dirofilariose à <i>Dirofilaria immitis</i> , d'après Hayasaki et al. 2013.....	56
Figure 32 : Radiographies thoraciques d'un chien atteint de dirofilariose cardio-pulmonaire	60
Figure 33 : Images échocardiographiques d'un chien atteint de dirofilariose cardio-pulmonaire. Noter la présence de deux filaires adultes qui apparaissent comme deux lignes hyperéchogènes parallèles. Crédit photographique : cal.vet.upenn.edu/project.....	62
Figure 34 : Radiographie thoracique d'un homme montrant un nodule pulmonaire attribué à <i>Dirofilaria immitis</i> D'après Simón et al. 2012.....	63
Figure 35 : Photographies de chien atteints de dirofilariose sous-cutanée.....	64
Figure 36 : Exemples d'atteintes oculaires liées à <i>Onchocerca lupi</i>	68
Figure 37 : Analyses histologiques de lésions d'onchocercose canine (A) Coupe histologique d'un nodule montrant plusieurs sections de filaires mâles et femelles gravides enroulées (B) Coupe histologique des tissus environnants mettant en évidence des microfilaries.....	69
Figure 38 : Observation d'une microfilaire de <i>Dirofilaria repens</i> sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa à l'objectif x40	71
Figure 39 : Observation de microfilaries de <i>Dirofilaria immitis</i> (à gauche) et de <i>Dirofilaria repens</i> (à droite) sur filtre <i>Filarassay</i> ® au grossissement x400	73
Figure 40 : Observation microscopique de microfilaries d' <i>Acanthocheilonema reconditum</i> (en haut) et de <i>Dirofilaria immitis</i> (en dessous). Crédit photographique: Byron Blagburn, PhD	74
Figure 41 : Schéma anatomique d'une microfilaire D'après Ducos de Lahitte 1990.....	74
Figure 42 : Représentation schématique des zones d'activité phosphatasique acide des microfilaries D'après Schrey and Trautvetter. 1998.....	75
Figure 43 : Observation microscopique des microfilaries et de leurs zones d'activité phosphatasique acide au grossissement x400. D'après Schrey and Trautvetter. 1998	76
Figure 44 : Microfilarie cutanée d' <i>Onchocerca lupi</i> observée au microscope photonique.....	79
Figure 45 : Principe du Snap Test® (d'après IDEXX)	81
Figure 46 : Représentation schématique du principe d'un test d'immunochromatographie modifié d'après un schéma de sciencesetavenir.fr.....	82
Figure 47 : Lecture des résultats du Snap Test Dirofilariose® des laboratoires IDEXX.....	82
Figure 48 : IMMATICIDE® des laboratoires Merial, le seul traitement adulticide avec une AMM	87

Figure 49 : Evolution de la microfilarémie chez des chiens recevant de l'ivermectine seule (IVM) 1 fois par semaine, de la doxycycline seule (DOXY) par intermittence, les deux (IVM+DOXY), avec ou sans mélarsonine (MEL) à la semaine 26 (protocole en 3 injections). Ces chiens s'étaient préalablement vu transplantés des filaires adultes 6 semaines avant le début du protocole. D'après McCall et al. 2008.	92
Figure 50 : Méthode d'extraction des filaires avec l'introduction d'un cathéter introducteur. (A) Introduction du cathéter introducteur dans la veine de jugulaire externe gauche guidée par le fil de guide pré placé dans l'atrium droit, le ventricule droit et l'artère pulmonaire. (B) et (C) Introduction de la pince préhensile pour retirer les vers sous contrôle fluoroscopique. D'après Won-Kyoung Yoon et al. 2011	95
Figure 51 : Schéma récapitulatif du protocole de traitement actuellement recommandé par l'American Heartworm Society.....	96
Figure 52 : Trois exemples de spécialités vétérinaires disponibles pour prévenir les piqûres de moustiques, vecteurs de la dirofilariose cardio-pulmonaire.....	98
Figure 53 : Sensibilité des différents stades évolutifs de <i>Dirofilaria immitis</i> aux lactones macrocycliques et à la mélarsonine, d'après Wolstenholme et al. 2015	99
Figure 54 : Origine et profil épidémiologique des chiens dont le sang a été prélevé pour l'étude	111
Figure 55 : Illustration d'un test Filarassay® réalisé au laboratoire de parasitologie de l'ENVT Crédit photographique : J. Semat	113
Figure 56 : Observation de microfilaires de <i>Dirofilaria immitis</i> au microscope photonique au grossissement x 400.....	113
Figure 57 : Réalisation des Snap 4DX® au laboratoire de parasitologie de l'ENVT	114
Figure 58 : Protocole simplifié de la méthode d'extraction de l'ADN avec le kit QIAGEN « QIAamp® DNA Mini Kit », qui utilise la technologie basée sur la silice.	115
Figure 59 : Principe de la PCR quantitative utilisant un agent fluorescent se liant à l'ADN double brin (EvaGreen®). D'après Poitras et Houde. 2002	117
Figure 60 : Courbe d'amplification de la PCR en temps réel. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.....	117
Figure 61 : Représentation schématique de l'évolution de la fluorescence en fonction de la température (à gauche) et de la courbe de dissociation d'une réaction de qPCR (à droite). La température de fusion d'un double brin correspond à un pic sur cette courbe.....	118
Figure 62 : Courbe de dissociation obtenue à l'issue d'une réaction de qPCR qui illustre la présence d'une séquence amplifiée non spécifique.	118
Figure 63 : Microplaques PCR 96 puits Thermo Scientific AB-0600.....	122
Figure 64 : Représentation schématique d'un plan de plaque de la qPCR avec 19 échantillons à tester	122
Figure 65 : Observation microscopique d'une microfilaire de <i>Dirofilaria repens</i> (identification moléculaire à postériori) sur le prélèvement de sang du chien V1 issu de la Clinique Vétérinaire du Vernet (31) par la méthode par filtration au grossissement x400.....	125
Figure 66 : Observation microscopique de microfilaires de <i>Dirofilaria immitis</i> (identification moléculaire à postériori) sur le prélèvement de sang du chien R10 provenant de la Réunion par la méthode par filtration Filarassay® au grossissement x 100 (à gauche) et x400 (à droite).....	125
Figure 67 : Résultats des Snap 4DX®IDEXX sur le sang des chiens provenant de Guadeloupe.....	126

Figure 68 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extraits de filaires adultes des deux espèces : deux pics matérialisent des températures de fusion Tm différentes : un premier pic à 71,2°C pour l'extrait d'ADN de <i>Dirofilaria repens</i> et un deuxième à 76,7°C pour l'extrait d'ADN de <i>Dirofilaria immitis</i>	128
Figure 69 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extraits de filaires adultes de <i>Dirofilaria immitis</i> et de <i>Dirofilaria repens</i> provenant de Cluj-Napoca en Roumanie.....	129
Figure 70 : Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien ENVT 1 après dilution au 1/10 ^{ème} , le pic à 70,7°C correspondant à l'espèce <i>Dirofilaria repens</i>	131
Figure 71 : Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien ENVT 2 après dilution au 1/10 ^{ème} , le pic à 70,7°C correspondant à l'espèce <i>Dirofilaria repens</i>	132
Figure 72 : Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien V1 de la clinique vétérinaire du Vernet (31) après dilution au 1/10 ^{ème}	132
Figure 73: Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien V2 de la clinique vétérinaire du Vernet (31) après dilution au 1/10 ^{ème}	133
Figure 74 : Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien F1 du refuge de Flayosc (83) après dilution au 1/10 ^{ème}	133
Figure 75 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extrait du sang des chiens R10 (à gauche) et RL (à droite) de la Réunion.....	134
Figure 76 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extrait du sang des chiens G3 (à gauche) et G4 (à droite) de Guadeloupe.....	134
Figure 77 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extrait du sang des chiens C6 (à gauche) et NC11 dilué au 1/10 ^{ème} (à droite) de Nouvelle-Calédonie	135

Table des tableaux

Tableau 1 : Espèces de moustiques vecteurs et localisation de la région dans laquelle la transmission de <i>Dirofilaria immitis</i> a été démontrée, tableau traduit en français d'après Simón et al. 2012.....	30
Tableau 2 : Modifications biochimiques fréquemment rencontrées lors de dirofilariose à <i>Dirofilaria immitis</i>	57
Tableau 3 : Modifications hématologiques fréquemment rencontrées lors de dirofilariose à <i>Dirofilaria immitis</i>	57
Tableau 4 : Modifications biochimiques et hématologiques fréquemment rencontrées lors de Syndrome de la Veine Cave	58
Tableau 5 : Description des anomalies radiologiques selon le stade d'évolution de la dirofilariose cardio-pulmonaire	59
Tableau 6 : Espèces d'helminthes impliquées dans des affections oculaires chez le chien d'après Sréter et Széll. 2008.....	69
Tableau 7 : Caractères morphologiques des microfilaires sanguines rencontrées chez le chien D'après Magnis et al. 2013 et Euzéby. 1990	74
Tableau 8 : Localisation des principaux éléments anatomiques des microfilaires sanguines du chien en % par rapport à la longueur totale	74
Tableau 9 : Caractères morphologiques des microfilaires sanguines, dermiques et des larves cutanées rencontrées chez le chien. D'après Sréter et Széll. 2008.....	78
Tableau 10 : Recommandations actuelles en termes de protocole de traitement de la dirofilariose canine à <i>Dirofilaria immitis</i> , d'après les recommandations de l'American Heartworm Society.....	97
Tableau 11 : Les spécialités vétérinaires disponibles disposant d'une AMM pour la prévention de la dirofilariose canine	100
Tableau 12 : Amorces utilisées pour la détection de l'ADN de <i>Dirofilaria immitis</i> , d'après Latrofa et al. 2012.....	120
Tableau 13 : Amorces utilisées pour la détection de l'ADN de <i>Dirofilaria repens</i> , d'après Latrofa et al. 2012.....	120
Tableau 14 : Tableau récapitulatif des composants intervenants dans la PCR quantitative duplex....	122
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la recherche de microfilaires sanguines de <i>Dirofilaria immitis</i> et <i>Dirofilaria repens</i> avec la méthode par filtration Filarassay® et pour le Snap 4DX® d>IDEXX pour la recherche des antigènes de <i>Dirofilaria immitis</i>	126
Tableau 16 : Récapitulatif des températures de fusion et des Ct obtenus pour les extraits d'ADN des 2 espèces de filaires provenant de l'Université de Bari en Italie (résultats en triplicata).....	128
Tableau 17 : Tableau récapitulatif des températures de fusion et des Ct obtenus pour les extraits d'ADN des 2 espèces de filaires provenant de l'Université de Cluj-Napoca en Roumanie (résultats en triplicata)	129
Tableau 18 : Tableau récapitulatif des résultats de Ct obtenus en qPCR simplex pour chaque couple d'amorces avec l'ADN de chacune des 2 espèces de filaires provenant de l'Université de Cluj-Napoca en Roumanie.....	130
Tableau 19 : Nombres de cycle de qPCR (Ct) permettant aux sondes fluorescentes de dépasser le seuil de positivité pour les chiens de Nouvelle-Calédonie dont la qPCR est positive	135

Tableau 20 : Récapitulatif des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques sur les chiens provenant de l'ENVIT et de la Clinique Vétérinaire du Vernet (31).....	136
Tableau 21 : Récapitulatif des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques sur les chiens provenant de la Réunion.....	137
Tableau 22 : Récapitulatif des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques sur les chiens provenant de Guadeloupe.....	137
Tableau 23 : Récapitulatif des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques sur les chiens provenant de Nouvelle-Calédonie.....	138
Tableau 24 : Tableau récapitulatif qui met en parallèle les résultats obtenus au test Filarassay® et au Snap 4DX® d>IDEXX avec ceux de la PCR quantitative. *Snap 4DX® positif pour <i>Dirofilaria immitis</i>	138
Tableau 25 : Tableau croisé des résultats obtenus pour le test Filarassay® et la qPCR pour détecter une infestation par <i>Dirofilaria immitis</i> à partir de prélèvements sanguins de chiens. NB : Le nombre total d'échantillons est ici de 58 car le Filarassay® n'a pas pu être réalisé sur 7 prélèvements.....	139
Tableau 26 : Sensibilité, Spécificité et coefficient Kappa de la qPCR en comparaison avec le test Filarassay® calculés à l'aide du logiciel DAG_Stat.....	139
Tableau 27 : Tableau croisé des résultats obtenus pour le test Snap 4DX® et la qPCR pour détecter une infestation par <i>Dirofilaria immitis</i> à partir de prélèvements sanguins de chiens.....	140
Tableau 28 : Sensibilité, Spécificité et coefficient Kappa de la qPCR en comparaison avec le test Snap 4DX® calculés à l'aide du logiciel DAG_Stat.....	140
Tableau 29 : Nombre de chiens inclus dans l'étude qui sont infestés par <i>Dirofilaria immitis</i> ou par <i>Dirofilaria repens</i> en France métropolitaine et dans les DOM-TOM.....	149
Tableau 30 : Résultats obtenus avec le test Filarassay®, le Snap 4DX® et la PCR quantitative sur les chiens inclus dans l'étude et provenant de France métropolitaine et des DOM-TOM.....	149

Introduction

Les filarioses les plus fréquemment rencontrées chez le chien en Europe sont imputables à deux espèces appartenant au genre *Dirofilaria* : *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens*. Leur cycle évolutif fait intervenir des hôtes intermédiaires de la famille des Culicidés qui transmettent les parasites au cours d'un repas sanguin. Ces deux espèces de filaires ont un potentiel zoonotique, d'où l'importance de les dépister et de les traiter afin d'éviter qu'ils ne servent de réservoir à d'éventuelles infestations humaines.

Dirofilaria immitis est l'espèce la plus pathogène chez le chien et est responsable de la dirofilariose cardio-pulmonaire, une maladie potentiellement mortelle. Les vers adultes sont localisés dans les artères pulmonaires et le cœur droit et sont responsables du développement d'une hypertension pulmonaire et d'une insuffisance cardiaque droite.

Dirofilaria repens est à l'origine de la dirofilariose sous-cutanée chez le chien. Cette filaire est peu pathogène et l'infestation est le plus souvent asymptomatique. Néanmoins, il s'agit de l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infestations zoonotiques en Europe.

Les vers femelles de ces deux espèces produisent des microfilaires qui sont libérées dans la circulation sanguine et qui peuvent être observées directement à l'examen du frottis sanguin (sauf dans les cas de dirofilariose occulte). Des méthodes de concentration de ces microfilaires existent et permettent d'augmenter la sensibilité de la détection. Néanmoins, la différenciation morphologique des microfilaires des deux espèces est difficile et nécessite une coloration histochimique, longue et fastidieuse à réaliser pour l'opérateur.

L'objectif de la partie expérimentale de ce travail de thèse est de développer une PCR quantitative duplex qui détecte simultanément les microfilaires de ces deux espèces et permet de les différencier à partir d'un prélèvement de sang périphérique chez le chien.

Partie 1 : Étude bibliographique

La dirofilariose canine à *Dirofilaria immitis* et les autres filarioses du chien

I. Les espèces de filaires parasites du chien

1) Classification systématique des filaires du chien

Les principales espèces de filaires parasites du chien appartiennent aux genres *Dirofilaria*, *Acanthocheilonema*, *Cercopithifilaria* et *Onchocerca*.

Elles se classent dans l'embranchement des Nématodes qui sont des vers cylindriques, non segmentés, pseudo-coelomates avec un tube digestif complet et des sexes séparés.

Elles appartiennent à l'ordre des Spirurida, caractérisé par la présence de phasmides (organes sensoriels en position caudale), d'une bouche non trilabée, d'un œsophage dépourvu d'élément glandulaire sacciforme et par l'absence de bourse copulatrice chez le mâle (Ducos de Lahitte. 1990).

La dénomination « filaire » provient de l'appartenance à la super-famille des Filarioidea : ces vers sont très allongés, filiformes et ne présentent pas de vestibule buccal. Leur vulve est antérieure.

L'absence de vulve juxta-buccale classe les filaires du chien dans la famille des Onchocercidae chez laquelle les vers adultes produisent des larves dénommées microfilaires.

Dans cette famille, on distingue deux sous-familles :

- Les Dirofilarinae avec *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens*.

Le genre *Dirofilaria* se caractérise par des spicules très inégaux, par des ailes caudales très développées soutenues par de grosses papilles cloacales chez les individus mâles et par l'absence d'ailes latérales.

- Les Onchocercinae avec :

- *Acanthocheilonema reconditum* (antérieurement *Dipetalonema reconditum*)
- *Acanthocheilonema dracunculoïdes* (anciennement *Dipetalonema dracunculoïdes*)
- Le genre *Cercopithifilaria* (*Cercopithifilaria baina*, *Cercopithifilaria sp.II* et *Cercopithifilaria grassii*)
- *Onchocerca lupi*

La Figure 1 résume la classification taxonomique des principales espèces de filaires rencontrées chez le chien.

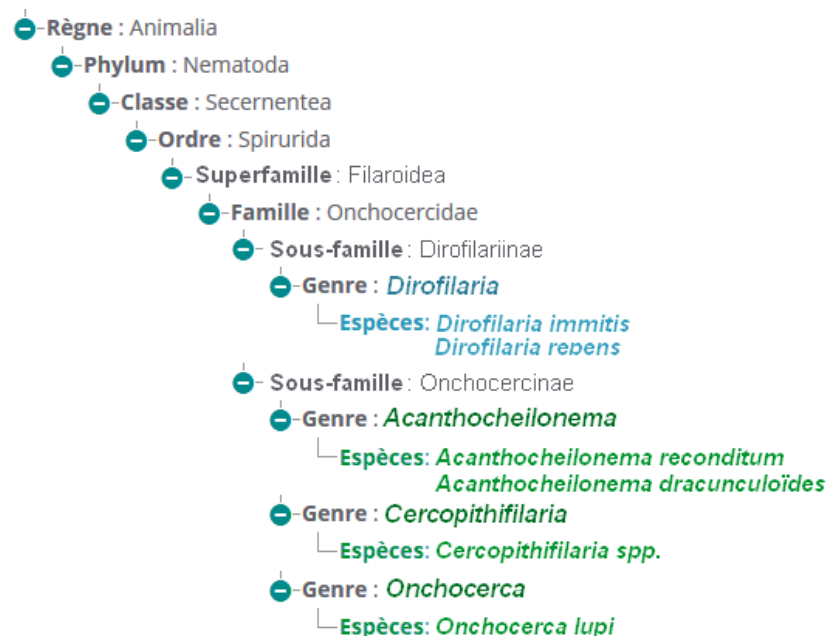


Figure 1 : Classification taxonomique des principales espèces de filaires parasites du chien
Crédit Illustration : J. Semat

Le chien est l'hôte définitif des espèces de filaires précédemment citées qui sont des parasites du système cardio-vasculaire pour *Dirofilaria immitis*, du tissu conjonctif pour *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema reconditum* et *Cercopithifilaria spp.*, de la cavité péritonéale pour *Acanthocheilonema dracunculoïdes* ou de la région périorbitaire pour *Onchocerca lupi*. Certaines de ces espèces ont un potentiel zoonotique et peuvent être impliquées dans des infestations humaines. Leur prévalence ainsi que leur pouvoir pathogène sont très différents.

Dirofilaria immitis et *Dirofilaria repens* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées en Europe. *Dirofilaria immitis* présente un pouvoir pathogène important chez le chien et est à l'origine de la dirofilariose cardio-pulmonaire, une maladie potentiellement mortelle. L'infestation du chien par *Dirofilaria repens*, agent de la dirofilariose sous-cutanée, est le plus souvent asymptomatique mais il s'agit de l'espèce de filaire la plus souvent impliquée dans les infestations zoonotiques en Europe (Simón et al. 2012).

Les espèces du genre *Acanthocheilonema* et *Cercopithifilaria* sont beaucoup moins fréquentes et leur pouvoir pathogène est plus anecdotique. *Onchocerca lupi* est un parasite récemment reconnu causant des lésions nodulaires associées à une atteinte oculaire chez le chien (Sréter et Széll. 2008).

Il faut tenir compte de l'existence de ces espèces dans la diagnose différentielle des microfilaires puisque les espèces des genres *Dirofilaria* et *Acanthocheilonema* produisent toutes des larves L1 qui sont libérées dans la circulation sanguine du chien. Pour *Onchocerca lupi* et *Cercopithifilaria spp.*, les microfilaires sont présentes dans le derme mais pourraient accidentellement être retrouvées sur des étalements sanguins si elles ont été ponctionnées dans la peau au moment du prélèvement.

2) Répartition géographique

a) Répartition géographique des filarioses canines

Les filarioses sont des parasitoses rencontrées sur tous les continents du globe et dont la répartition est étroitement liée à celle de leurs vecteurs arthropodes hématophages.

Dirofilaria immitis est endémique en Amérique, en Afrique, en Asie, en Australie et au sud de l'Europe. Cette espèce est particulièrement présente dans les zones humides et chaudes avec un climat sub-tropical propice au développement des moustiques vecteurs mais elle s'est établie dans des régions plus tempérées durant les vingt dernières années. La répartition des cas de dirofilariose canine à *Dirofilaria immitis* sera détaillée dans la partie 6) a).

Dirofilaria repens est présente en Afrique, en Asie et en Europe chez mais elle n'a jamais été signalée sur le continent américain ou en Océanie : par conséquent, le problème du diagnostic différentiel de ses microfilaires avec celles de *Dirofilaria immitis* ne se pose pas dans ces régions.

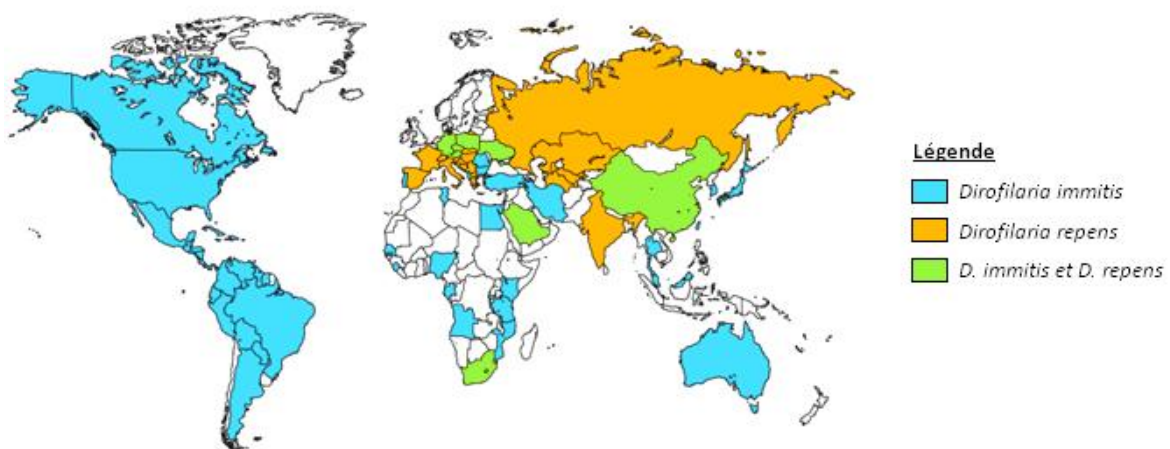


Figure 2 : Distribution géographique actuelle des parasites *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens* d'après Simón et al, 2012

En Europe, le profil épidémiologique de la dirofilariose canine se caractérise par la présence des deux espèces de filaires *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens* qui coexistent dans certaines régions. Leur aire de répartition tend à s'étendre vers l'Europe centrale et l'Europe du Nord. Ainsi, *Dirofilaria repens* a été détectée récemment dans de nouvelles régions telles que l'Ukraine, l'Allemagne et le Moyen-Orient. En Italie, la prévalence de *Dirofilaria repens* atteint les 30% dans la Plaine du Pô (Tarello. 2010).

En France, *Dirofilaria repens* est plus largement répartie que *Dirofilaria immitis* : elle est retrouvée en Corse, dans les Bouches du Rhône, dans le Vaucluse, en Haute-Garonne, en Dordogne, dans le Gard, le Gers, en Gironde, en Corrèze, dans la Vienne, le Loir-et-Cher et la région parisienne. La prévalence nationale a été estimée à 1,3% dans une étude publiée en 1986 qui se basait sur la détection des microfilaires dans le sang de 5503 chiens (Ducos de Lahitte. 1990).

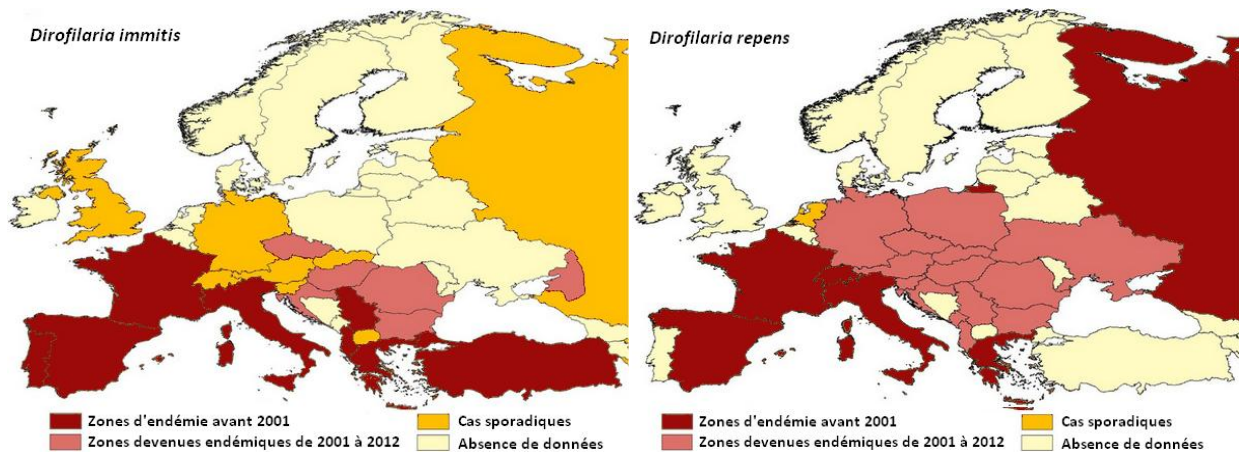


Figure 3 : Zones approximatives d'enzootie de *Dirofilaria immitis* (à gauche) et *Dirofilaria repens* (à droite) en Europe d'après Otranto et al. 2013

Acanthocheilonema reconditum a une distribution mondiale : elle est signalée en Europe au niveau du bassin méditerranéen, au Moyen-Orient, en Amérique, en Afrique du Sud, en Asie et en Océanie. Cette filaire est largement présente aux Etats-Unis où ses microfilaires sanguines doivent être différenciées de celles de *Dirofilaria immitis*.

En Sicile, une étude menée sur 2512 chiens par Giannetto et al. en 2007 a démontré qu'il s'agissait de l'espèce de filaire la plus fréquente avec une prévalence de 4-5%. Sa présence en France est plus anecdotique : elle a été estimée à 0,05 % dans une étude publiée en 1990 (Ducos de Lahitte. 1990).

L'aire de distribution d'*Acanthocheilonema dracunculoides* est réduite à l'Afrique et dans une moindre mesure, à l'Europe. En Afrique, cette filaire est endémique au Maroc, en Algérie, en

Tunisie, au Mali, au Niger, au Congo, au Soudan, en Somalie, au Kenya, en Tanzanie et en Afrique du Sud (Schwan et Schröter. 2006).

Les espèces du genre *Cercopithifilaria* sont décrites en Europe et au Brésil. L'espèce *Cercopithifilaria grassii*, initialement décrite comme *Filaria grassii* en 1907 a été retrouvée en Italie, en Sicile et en Espagne. *Cercopithifilaria bainaie*, découverte au Brésil a été décrite chez des chiens en Italie, en Espagne et en Grèce. La dernière espèce *Cercopithifilaria sp. II* a été mise en évidence en 2012 en Italie et en Espagne (Cortes et al. 2014).

Onchocerca lupi est présente en Europe (Grèce, Portugal, Allemagne, Hongrie, Suisse) et aux Etats-Unis (Otranto et al. 2013).

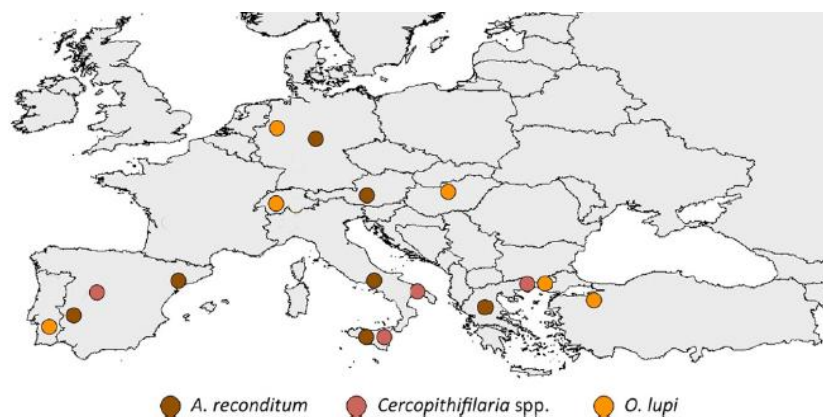


Figure 4 : Distribution d'*Acanthocheilonema reconditum*, *Cercopithifilaria* spp. et *Onchocerca lupi* en Europe d'après Otranto et al. 2013

b) Répartition géographique des cas zoonotiques liés aux filaires du chien

▪ Les cas de Dirofilariose humaine

Les espèces *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens* possèdent toutes deux un potentiel zoonotique. La distribution mondiale des cas humains ne coïncide pas exactement avec celle des cas de dirofilariose canine, principalement en raison du manque de données puisqu'il existe des pays pour lesquels des cas humains sont rapportés en l'absence de données sur les infestations canines.

Selon des données de 2012, 1782 cas d'infestations humaines par les espèces du genre *Dirofilaria* ont été recensées : 372 sont imputables à *Dirofilaria immitis* qui entraîne des atteintes pulmonaires chez les patients infestés ; 1410 sont dus à *Dirofilaria repens* qui est à l'origine de troubles cutanés ou oculaires chez l'Homme (Simón et al. 2012).

Sur le continent américain, au Japon et en Australie, les cas humains sont imputables à *Dirofilaria immitis*, les infestations liées à *Dirofilaria repens* restant sporadiques.

En Europe, où ces deux espèces de filaires coexistent dans les populations canines réservoirs, les cas d'infestation humaine impliquant *Dirofilaria repens* (586 cas rapportés) prédominent largement sur les cas liés à *Dirofilaria immitis* (33 cas), même dans des zones de forte prévalence de cette dernière.

La France a recensé 71 cas de dirofilariose humaine à *Dirofilaria repens* et 2 cas de dirofilariose pulmonaire attribuée à *Dirofilaria immitis*. Elle est le deuxième pays d'Europe après l'Italie en nombre de cas humains recensés pour cette zoonose émergente (Simón et al. 2012).

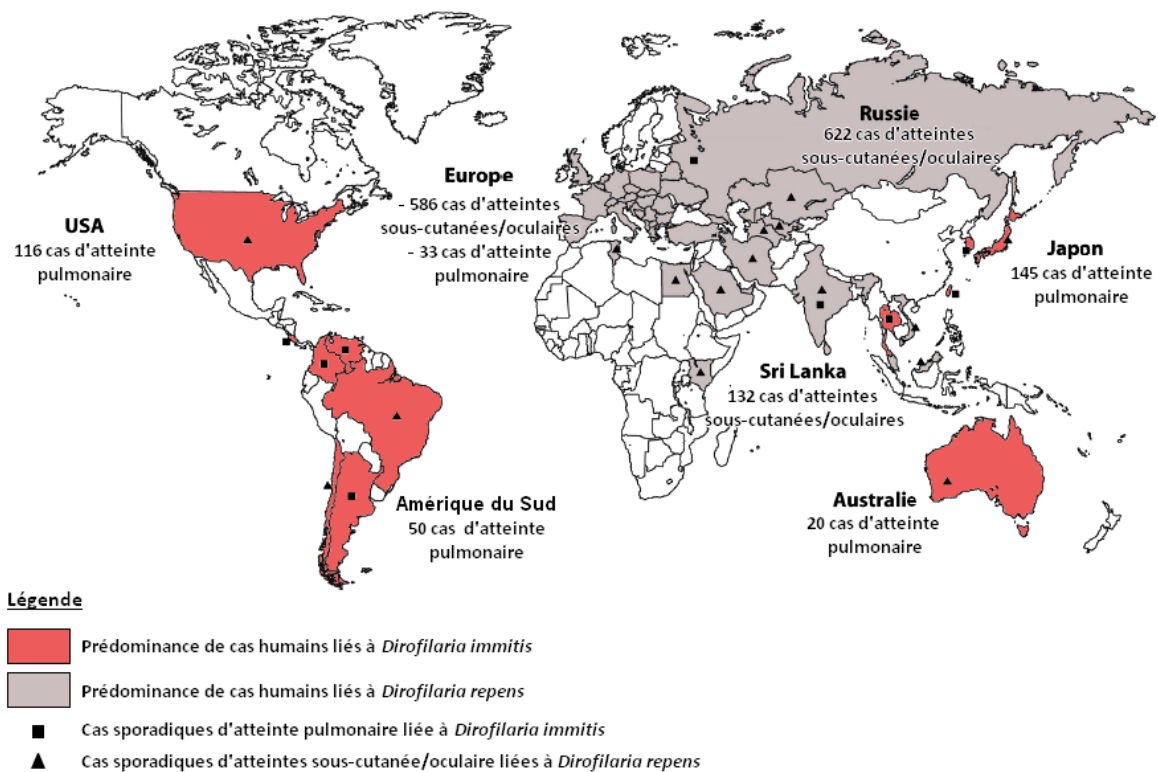


Figure 5 : Distribution actuelle des cas de dirofilariose humaine liée à *Dirofilaria immitis* et à *Dirofilaria repens* d'après Simón et al. 2012

• **Les cas humains liés aux filaires des genres *Acanthocheilonema* et *Cercopithifilaria***

Le potentiel zoonotique de ces espèces de filaires est quasi nul : un seul cas humain a été décrit en 2001 en Australie impliquant *Acanthocheilonema reconditum* et dans lequel une filaire adulte a été retrouvée en position sous-conjonctivale (Huynh et al. 2001).

- **Les cas humains liés à *Onchocerca lupi***

Le potentiel zoonotique de cette filaire a été soupçonné pour la première fois en 2002 et a été confirmé en 2011 en Turquie où des nématodes sous-conjonctivaux ont été identifiés par analyse moléculaire comme étant des vers adultes appartenant à l'espèce *Onchocerca lupi* (Otranto et al. 2011). Depuis, des dizaines de cas humains ont été rapportés en Turquie, en Tunisie, en Iran et aux États-Unis (Baneth et al. 2015).

3) Morphologie des filaires adultes et des microfilaires

a) Morphologie des vers adultes

- ***Dirofilaria immitis***

Les filaires adultes de *Dirofilaria immitis* ont l'aspect d'une corde à violon blanchâtre. Les femelles mesurent jusqu'à 30 cm de long pour 1 mm de diamètre. Les mâles sont plus petits et plus fins et mesurent entre 12 et 18 cm de long pour 600 µm de diamètre. L'orifice buccal est entouré de 8 papilles médianes et de 2 papilles latérales. Le mâle est identifiable par son extrémité caudale spiralée, en tire-bouchon qui porte 4 à 6 paires de volumineuses papilles pédonculées et ovoïdes (Ducos de Lahitte. 1990).



Figure 6 : Schéma de filaires adultes mâle et femelle de *Dirofilaria immitis* (Railliet Alcide, 1895)

- ***Dirofilaria repens***

Les filaires adultes de *Dirofilaria repens*, parasites du tissu sous-cutané, ont une taille inférieure à celle de *Dirofilaria immitis*. Le mâle mesure 5 à 7 cm de long sur 370 à 450 µm de large. Il possède 2 à 4 papilles pré-anales d'un côté et 5 ou 6 de l'autre. Les deux spicules sont inégaux et mesurent 465 à 590 µm et 185 à 206 µm. La femelle mesure 10 à 17 cm de long sur 460 à 650 µm de diamètre. Sa vulve est distante de 1,5 mm à 1,62 mm de l'extrémité antérieure (Ducos de Lahitte. 1990).

- ***Acanthocheilonema reconditum***

Cette filaire est plus petite que celles du genre *Dirofilaria*.

Le mâle mesure 9 à 17 mm de long sur 92 à 106 µm de large. Leur queue est spiralée et se termine par 3 pointes. Les spicules sont inégaux et mesurent respectivement 220 à 300 µm et 92 à 104 µm (Chauve, 1990). La femelle mesure 20 à 32 mm de long sur 146 à 186 µm de large. La vulve est située à 840 µm de l'extrémité antérieure.

- ***Acanthocheilonema dracunloïdes***

Acanthocheilonema dracunloïdes a une taille supérieure à celle d'*Acanthocheilonema reconditum*. Le mâle mesure 15 à 32 mm de long sur 100 à 200 µm. Son extrémité caudale est spiralée. Les papilles génitales, au nombre de 5, sont très petites. Les spicules sont inégaux et mesurent respectivement 320 à 390 µm et 120 à 160 µm. La femelle mesure 30 à 60 mm de long et 100 à 300 µm de large (Schwan et Schröter. 2006). L'extrémité postérieure est souvent relevée vers la face dorsale. La vulve est éloignée de 1000 µm de l'extrémité céphalique.

- ***Cercopithifilaria spp.***

Les filaires adultes de *Cercopithifilaria grassi* sont longues de 7 à 8 mm pour les mâles et de 17 à 21 mm pour les femelles. L'extrémité antérieure présente un rétrécissement suivi de deux renflements. Pour les adultes de *Cercopithifilaria bainaie* : les mâles mesurent entre 9 mm à 12 mm de long sur 44 µm de large et les femelles 14 mm à 19 mm de long pour 72 à 100 µm de large (Otranto et al. 2011). La morphologie des adultes *Cercopithifilaria sp.II* n'est pas connue (Ionică et al. 2014).

- ***Onchocerca lupi***

Les adultes sont de minces vers blanchâtres : les mâles mesurent 4 à 5 cm de long pour 100 à 200 µm de diamètre, les femelles dépassent les 10 cm pour un diamètre de 200 à 400 µm. L'extrémité antérieure est arrondie. La cuticule est striée transversalement.

Chez le mâle, les papilles caudales sont grandes et charnues, le spicule gauche, long de 160-200 µm est légèrement courbé, tubulaire et tandis que le spicule droit est 2 fois plus court et plus large dans sa partie proximale (Sréter et Széll. 2008).

Chez la femelle, la cuticule est composée de deux couches distinctes avec une couche externe qui porte des arêtes disposées en anneau et une couche plus interne avec des stries.

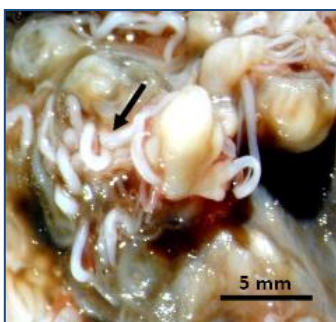


Figure 7 : Vers adultes d'*Onchocerca lupi* au sein d'une masse rétro-bulbaire d'un chien
Crédit photographique : Sréter et Széll. 2008



Figure 8 : Coupe histologique d'un nodule sous conjonctival montrant les caractéristiques de la cuticule de la femelle d'*Onchocerca lupi* avec les arêtes (flèches) et les stries (triangles)
D'après Sréter et Széll. 2008

b) Morphologie des microfilaires (larves L1)

▪ *Dirofilaria immitis*

Les larves L1 ou microfilaires de *Dirofilaria immitis* pondues par les femelles fécondées dans le sang périphérique mesurent 290 à 330 μm de long sur 5 à 7 μm de large (Lichtenfelds et al. 1985). Elles sont nues, c'est-à-dire non entourées d'une gaine. Leur queue est rectiligne, fine et allongée.

▪ *Dirofilaria repens*

Les microfilaires de *Dirofilaria repens* sont non-engainées et mesurent 300 à 370 μm de long sur 5-8 μm de large. L'extrémité caudale est filiforme et incurvée en « hameçon ».

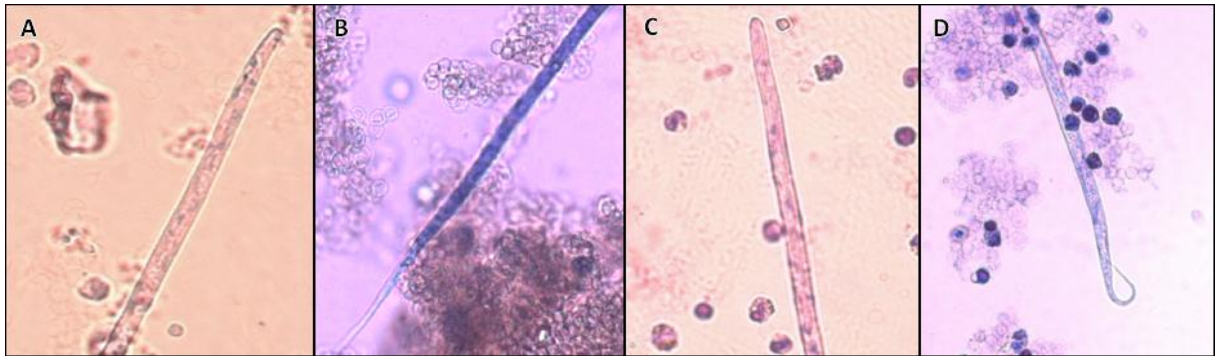


Figure 9 : Extrémités antérieures et postérieures des microfilaires de *Dirofilaria immitis* (A-B) et *Dirofilaria repens* (C-D) D'après Traversa et al. 2010

▪ *Acanthocheilonema reconditum*

Les microfilaires d'*Acanthocheilonema reconditum* sont nues et mesurent 263 à 283 μm de long sur 4 μm de large. Leur extrémité caudale est incurvée et forme un « crochet » caractéristique. Le corps interne est visible au niveau du tiers caudal de la larve.



Figure 10 : Observations de microfilaires d'*Acanthocheilonema reconditum* au microscope photonique (A) Microfilaire entière ; (B) Extrémité caudale en crochet ; (C) Corps interne D'après Napoli et al. 2014 & Rodríguez García 1990

▪ *Acanthocheilonema dracunloïdes*

Les microfilaires sont non-engainées et mesurent 185 à 230 μm de long sur 5-6 μm de diamètre. L'extrémité caudale est pointue et longue.

D'après une étude expérimentale publiée en 2013 par Magnis et al. et menée sur 377 chiens infestés provenant de différents pays d'Europe, la longueur moyenne des microfilaries pour ces quatre espèces était de :

- $301,77 \pm 6,29 \mu\text{m}$ pour *Dirofilaria immitis* (sur 60 chiens)
- $369,44 \pm 10,76 \mu\text{m}$ pour *Dirofilaria repens* (sur 171 chiens)
- $259,43 \pm 6,69 \mu\text{m}$ pour *Acanthocheilonema dracunculoides* (sur 133 chiens)
- $264,83 \pm 5,47 \mu\text{m}$ pour *Acanthocheilonema reconditum* (sur 13 chiens)

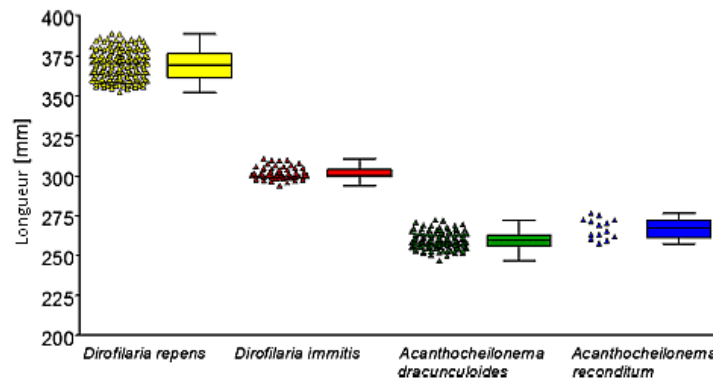


Figure 11 : Taille moyenne des microfilaries évaluée après fixation avec la technique de Knott modifié sur 377 chiens D'après Magnis et al. 2013

▪ ***Cercopithifilaria spp.***

Les microfilaries du genre sont enveloppées d'une mince gaine, sont aplaties dorso-ventralement et présentent un crochet céphalique gauche minuscule. Leur extrémité caudale n'est pas filiforme mais incurvée.

Les microfilaries de l'espèce *Cercopithifilaria grassii* sont de très grande taille comparée aux autres du genre et mesurent entre 567 et 660 μm de long sur 12,2 à 15,5 μm de large. Leur extrémité caudale est bifide.

Les microfilaries de *Cercopithifilaria baina* et de *Cercopithifilaria sp.II* mesurent respectivement 185,18 μm de long pour 6,59 de large et 182 à 190 μm de long sur 3 à 3,5 μm de large (Otranto et al. 2011).

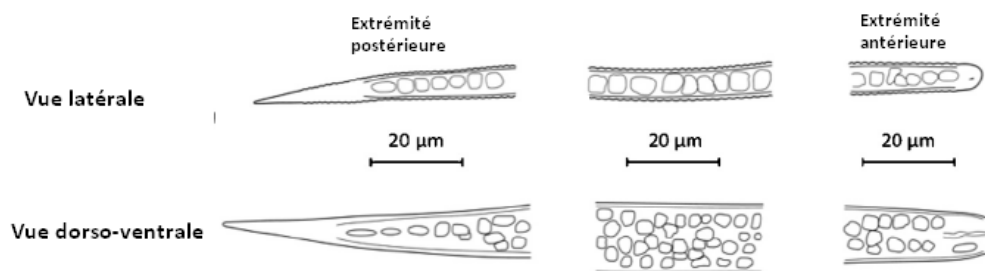


Figure 12 : Schéma représentant une microfilarie de l'espèce *Cercopithifilaria sp.II* en vue latérale et en vue dorso-ventrale, d'après Otranto et al. 2011

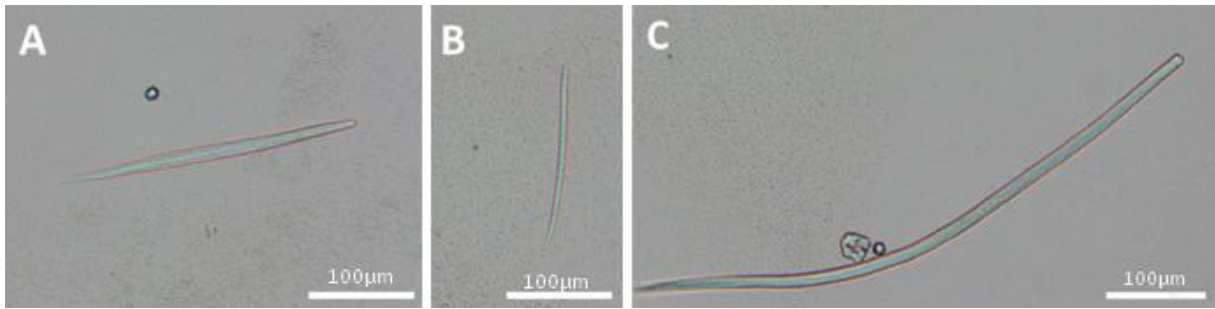


Figure 13: Observation microscopique de microfilaries de : (A) *Cercopithifilaria* sp. II; (B) *Cercopithifilaria baina* ; (C) *Cercopithifilaria grassii*
D'après Cortes et al. 2014

- ***Onchocerca lupi***

Les microfilaries, qui sont libérées dans le derme sont droites, non engainées, avec une longueur de 98 à 118 µm et une largeur de 5-7 µm. L'extrémité antérieure est arrondie et contient deux à trois noyaux par rangée. La queue est effilée et contient une colonne de noyaux réduite à une seule rangée de trois (Egyed et al. 2001).



Figure 14 : Microfilarie cutanée d'*Onchocerca lupi* observée au microscope électronique. D'après Otranto et al. 2013

4) Biologie et cycle évolutif

Toutes les espèces de filaires parasites du chien présentent un cycle évolutif de type dixène obligatoire. Il fait intervenir des hôtes définitifs vertébrés et des hôtes intermédiaires arthropodes qui jouent le rôle de vecteurs, sans passage du parasite dans le milieu extérieur.

a) *Dirofilaria immitis*

Le cycle évolutif de *Dirofilaria immitis* est un cycle dixène obligatoire qui dure en moyenne entre 6 et 9 mois (Kotani et Powers. 1982).

i. Hôtes définitifs

Le chien et les canidés sauvages tels que le renard, le loup et le coyote sont les hôtes définitifs classiques de *Dirofilaria immitis* et en constituent les principaux réservoirs. Néanmoins, d'autres espèces peuvent permettre le développement complet du parasite qui présente une faible spécificité d'hôte : c'est le cas des félidés, des mustélidés tels que le furet, des ursidés mais aussi des pinnipèdes (otaries, phoques) chez qui une microfilarémie transitoire a été rapportée (Ducos de Lahitte. 1990).

Les chats sont moins réceptifs que les chiens et ne s'infestent que dans les zones de forte endémie. La prévalence observée chez les félins correspond à 5 à 20% de la prévalence observée dans la population canine pour une région donnée. L'infestation chez le chat est caractérisée par un faible nombre de filaires adultes, 2 à 4 en moyenne qui ont une durée de vie de 2 à 4 ans au maximum. La microfilarémie est rare : seuls 20% des chats infestés par des vers adultes présentent des microfaires sanguines et ces dernières ne survivent pas plus d'un à 2 mois (Lee et Atkins. 2010) : cette espèce n'est donc pas un réservoir majeur du parasite. Les chats infestés sont souvent asymptomatiques et la guérison spontanée est possible avec la mort des filaires adultes. Il existe pourtant des cas rares d'atteintes respiratoires aiguës qui font suite à la réaction inflammatoire liée à l'arrivée des microfaires dans les artères pulmonaires ou à la mort des adultes.

Il est important de souligner le potentiel zoonotique de *Dirofilaria immitis* : l'homme peut s'infester mais constitue une impasse épidémiologique et ne peut héberger que des formes immatures qui migrent et meurent enkystés au sein de nodules pulmonaires. Il ne constitue donc pas un réservoir de parasites pour les moustiques (Bourdoiseau. 2000).

Les filaires adultes vivent dans l'artère pulmonaire et ses ramifications ainsi que dans le ventricule cardiaque droit. Ils peuvent migrer dans l'oreillette droite voire la veine cave caudale si l'infestation est massive.

Des localisations erratiques ont également été décrites dans la chambre antérieure de l'œil, le tissu conjonctif sous-cutané, la moelle spinale et la cavité péritonéale.

Les vers adultes ne sont pas hématophages mais se nourrissent d'éléments dissous dans le plasma.

Ils peuvent survivre jusqu'à 7,5 ans chez le chien (Bowman et Atkins. 2009).

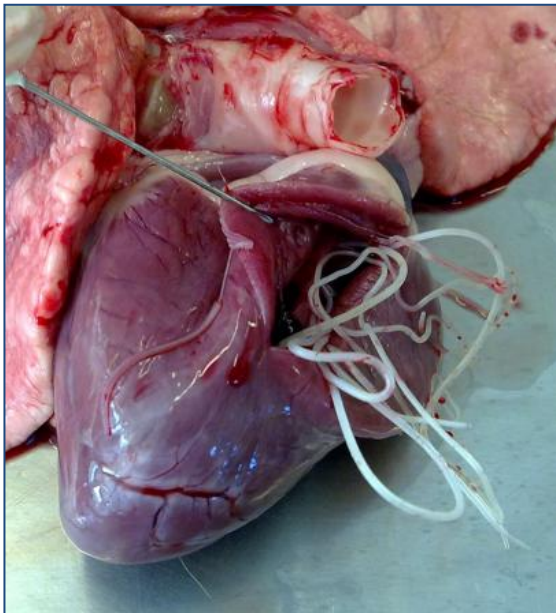


Figure 15 : Photographie de filaires adultes de *Dirofilaria immitis* dans le cœur droit d'un chien
Crédit photographique : Simón et al. 2012



Figure 16 : Modélisation de l'extrémité antérieure d'une filaire adulte de *Dirofilaria immitis*
Source : Curtis. 2015

Dirofilaria immitis est vivipare. Les femelles fécondées pondent des larves L1 nues appelées microfilaries dans le courant circulatoire qui vont principalement se localiser dans les capillaires du tissu conjonctif sous-cutané et intermusculaire de l'hôte définitif. Leur abondance dans la circulation superficielle n'est pas uniforme au cours de la journée et un pic de présence crépusculaire est rapporté : en France, la microfilarémie maximale est observée aux environs de 20h (Euzéby et Lainé. 1951). Il existe également des variations saisonnières de la microfilarémie avec des concentrations plus importantes en été et au printemps, périodes qui correspondent à la période d'activité des moustiques vecteurs (Bowman et Atkins. 2009).

Les microfilaries peuvent survivre jusqu'à 2,5 ans dans le sang circulant même après la mort des vers adultes (Bowman et Atkins. 2009). Notons qu'il n'existe pas de relation directe entre la microfilarémie et le nombre d'adultes présents.

Chez 20 à 30% des chiens infestés par *Dirofilaria immitis*, l'infestation est amicrofilarémique ou occulte : il n'y a pas de microfilaries circulantes dans le sang périphérique (Schrey et Trautvetter. 1998). Ce type d'infestation s'observe pendant la période pré-patente, lors d'infestation par un seul sexe, un seul ver (infestation mono-parasitaire), lorsque les parasites sont stériles, d'un âge trop avancé ou suite à l'administration de lactones macrocycliques ou de doxycycline. Il existe également des animaux qui développent des réactions d'hypersensibilité vis-à-vis des microfilaries sanguines qui sont détruites et indétectables dans le sang circulant.

La période pré-patente chez le chien, qui sépare le moment où le chien s'infeste de celui où des microfilaries sont présentes pour la première fois dans le sang circulant est de 6 à 9 mois (Kotani et Powers. 1982). Ainsi, si des microfilaries sont retrouvées chez un chiot de moins de 6 mois, il est fort probable qu'elles aient été transmises *in utero* et que l'animal ne soit pas porteur de filaires adultes.

ii. Hôtes intermédiaires

Les hôtes intermédiaires de *Dirofilaria immitis* sont des moustiques de la famille des Culicidés appartenant aux genres *Culex*, *Aedes* (sous genres : *Aedimorphus*, *Stegomyia*), *Anopheles*, *Mansonia*, *Armigeres*, *Ochlerotatus*, et *Coquillettidia* (Otranto et al. 2013).

Près de 70 espèces de moustiques ont été identifiées comme étant des vecteurs potentiels du parasite, ces espèces variant d'une région à l'autre du globe (Morchón et al. 2012).

En Europe, *Culex pipiens pipiens*, *Aedes albopictus* (dit moustique tigre) et *Aedes vexans* sont considérées comme les principales espèces impliquées dans la transmission des filaires du genre *Dirofilaria*. D'autres espèces ont également été recensées : *Culex theileri*, *Ochlerotatus caspius*, *Anopheles maculipennis*, *Dahlia geniculata*, *Coquillettidia richiardii*.

Aux États-Unis, *Aedes albopictus*, *Aedes sticticus*, *Aedes trivittatus*, *Aedes vexans*, et *Aedes canadensis* sont les vecteurs les plus fréquemment mis en cause.



Figure 17 : *Culex pipiens pipiens* (à gauche) et *Aedes albopictus* (à droite)
Crédit Illustration : Google Images

Le Tableau 1 recense les principales espèces de moustiques vecteurs de *Dirofilaria immitis*.

Tableau 1 : Espèces de moustiques vecteurs et localisation de la région dans laquelle la transmission de *Dirofilaria immitis* a été démontrée, tableau traduit en français d'après Simón et al. 2012

Espèces	Localisation
<i>Aedes aegypti</i>	Polynésie Française
<i>Aedes albopictus</i>	Argentine
	Italie
	USA
	Taiwan
<i>Aedes caspius</i>	Italie
<i>Aedes crucians</i>	USA
<i>Aedes notoscriptus</i>	Australie
<i>Aedes ochlerotatus</i>	Amerique
<i>Aedes punctipennis</i>	USA
<i>Aedes punctor</i>	Italie
<i>Aedes scapularis</i>	Brésil
<i>Aedes sierrensis</i>	Utah (USA)
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	Brésil
	Yucatan (Mexico)
<i>Aedes triseriatus</i>	Missouri (USA)
<i>Aedes vexans</i>	Turquie
<i>Anopheles maculipennis</i>	Italie
<i>Culiseta incidens</i>	Californie (USA)
<i>Culex annulirostris</i>	Australie
<i>Culex pipiens</i>	Italie
	Argentine
	Espagne
	Turquie
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Brésil
<i>Culex theileri</i>	Madeire (Portugal)
	Iran

En région tempérée, la période d'activité des moustiques se limite à la saison chaude (de Juin à Octobre). L'infestation du chien par *Dirofilaria immitis* a un caractère saisonnier. Certaines espèces de moustiques, comme *Culex pipiens*, sont actives seulement la nuit tandis que d'autres peuvent l'être au crépuscule voire en pleine journée : *Aedes albopictus*, *Anopheles maculipennis*.

Le moustique femelle est le seul vecteur naturel de transmission de *Dirofilaria immitis*. Il s'infeste en absorbant des microfilaries au cours de son repas sanguin de type solénoptère.

Le passage dans l'organisme du moustique est indispensable à la poursuite du cycle évolutif des microfilaries ou larves L1. Ces dernières atteignent les tubes de Malpighi du moustique 36 heures après l'infestation et deviennent des larves L2 au quatrième jour. Au neuvième jour, les larves passent au stade L3 et perforent la paroi des tubes de Malpighi pour atteindre la cavité générale du moustique, puis migrent dans le thorax, la trompe, et enfin dans la cavité du labium.

Ce sont ces larves L3 qui sont infestantes pour l'hôte définitif et qui vont être transmises à l'occasion d'un repas sanguin : les larves émergent de la trompe du moustique et sont déposées sur la peau. Elles sont recouvertes d'hémolymphe, les protégeant de la dessiccation jusqu'à ce qu'elles pénètrent activement dans le tissu sous-cutané du chien par la plaie de piqûre ou par un follicule pileux (McGreevy et al. 1974).

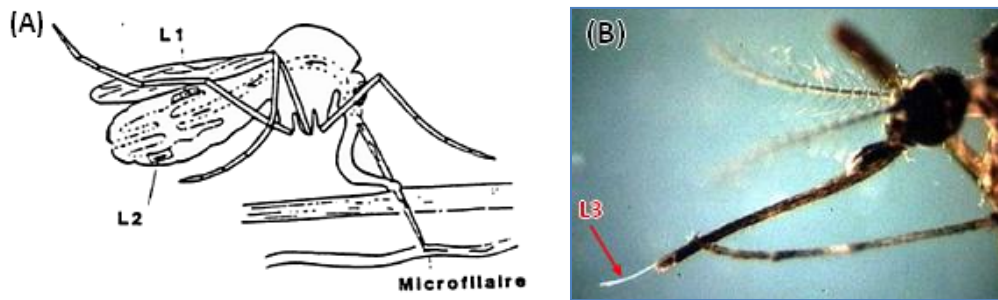


Figure 18 : (A) Schéma d'un moustique absorbant des microfaires au cours du repas sanguin (Sources : Cours ENVT)
 (B) Photographie de la trompe d'un moustique contenant une larve L3 (Sources : P. Bourdeau, ONIRIS)

La durée du cycle évolutif chez l'insecte est étroitement liée au climat : pour une température extérieure de 27°C, 10 à 14 jours séparent l'infestation de l'insecte du moment où il est capable d'inoculer des larves L3. Ce délai augmente si les températures sont plus basses et le cycle ne peut se dérouler à des températures inférieures à 14°C (Slocombe et al. 1989). Notons que la durée de vie moyenne pour le moustique vecteur est de 30 jours mais il a été démontré pour plusieurs espèces dont *Aedes albopictus* qu'elles pouvaient vivre sur des périodes plus longues de 3 mois (Löwenberg Neto and Navarro-Silva. 2004).

La Figure 19 s'appuie sur des relevés de températures réalisées dans toutes les régions d'Europe et propose un modèle qui présente le nombre de générations potentielles de *Dirofilaria immitis* chez le vecteur en une année. Ainsi, le sud de l'Europe est plus propice au développement du parasite du fait des températures plus clémentes : d'une part, la période d'activité des moustiques vecteurs est plus longue et d'autre part, le cycle de développement de la filaire, qui nécessite une température minimale et qui est d'autant plus rapide que la température est élevée, peut se poursuivre sur des périodes plus longues dans l'année.

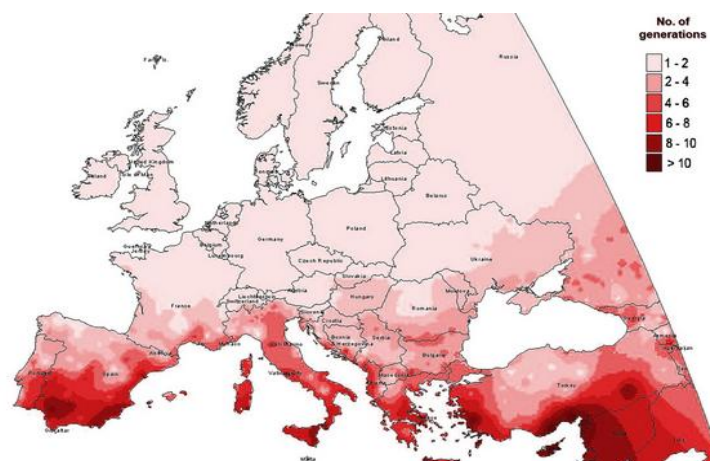


Figure 19 : Nombre de générations potentielles de *Dirofilaria immitis* chez les moustiques vecteurs en une année d'après Genchi et al. 2009

Le taux de mortalité chez les moustiques infestés par des stades larvaires de *Dirofilaria immitis* est plus important que chez des moustiques indemnes et est positivement corrélé au nombre de microfilaries ingérées (Serrão et al. 2001). Le nombre de microfilaries ingérées est directement lié à la microfilarémie du chien sur lequel est pris le repas de sang. Les microfilaries puis les stades larvaires L2 et L3 sont pathogènes pour les moustiques s'ils sont présents en trop grand nombre : la présence de plus de 5 à 10 larves L3 dans les tubes de Malpighi peut entraîner leur rupture et la mort de l'insecte. Ainsi, l'ingestion d'un grand nombre de microfilaries par le moustique vecteur au cours d'un repas de sang pris sur un chien présentant une microfilarémie élevée est associée à un taux de mortalité important chez ces derniers. Il a par exemple été démontré que pour un repas de sang pris sur un chien présentant 7000 microfilaries/mL de sang, le taux de survie des moustiques à 11 jours était de 1/10 (Serrão et al. 2001). Les animaux avec une forte microfilarémie ne constituent donc pas une bonne source de parasites puisque l'infestation du moustique est létale et ne permet pas la transmission à un autre hôte vertébré (Bowman et Atkins. 2009).

La capacité des moustiques à permettre le développement de *Dirofilaria immitis* et à résister à l'infestation est génétiquement déterminée et est contrôlée par des gènes récessifs liés au sexe. Les différences génétiques qui influencent la transmission peuvent aussi exister au sein d'une même espèce : ainsi, certaines souches permettraient l'évolution du parasite tandis que d'autres y seraient réfractaires (Morchón et al. 2007).

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

Chez le chien, les larves L3 transmises par le moustique profitent de l'effraction causée par la piqûre ou d'un follicule pileux pour pénétrer dans le tissu conjonctif sous-cutané.

Elles effectuent une migration conjonctivo-musculaire pendant laquelle elles muent en L4 au bout de 3 à 12 jours puis en L5 entre le 50^{ème} et le 70^{ème} jour après l'infestation (Simón et al. 2012). Notons que dans le premier mois de migration, les larves (L3 puis L4) sont sensibles aux lactones macrocycliques qui peuvent donc être utilisées en prévention de la maladie.

Les larves L5 pénètrent dans la circulation veineuse, transitent dans le cœur droit et atteignent le tronc pulmonaire puis les artères pulmonaires. Elles s'y développent pendant 1 à 2 mois avant d'effectuer une migration rétrograde vers le ventricule droit où elles deviendront des vers adultes, sexuellement matures environ 120 jours post-infestation.

Les femelles fécondées commenceront à produire des microfilaries (L1) dans le sang périphérique en moyenne 6,5 mois après l'infestation.

Dans les régions tempérées, l'infestation du chien se fait principalement entre Juin et Octobre, période qui correspond à la période d'activité des moustiques vecteurs. Les filaires adultes apparaissent dans le ventricule droit à partir du mois de Décembre et s'ensuit la production de microfilaries vers le mois de Février de l'année suivante. Ces données sont valables pour une primo-infestation, les microfilaries étant présentes toute l'année chez des chiens déjà parasités.

Chez les chiennes en gestation, il est rapporté que les microfilaries peuvent traverser le placenta et ainsi passer dans le sang des chiots. Cette microfilarémie peut être détectable mais ne signifie pas que l'animal va développer une dirofilariose puisque les larves L1 sont incapables de se développer dans l'organisme du chien. La transmission verticale de la maladie n'existe pas.

iv. **Schéma récapitulatif du cycle de *Dirofilaria immitis* chez le chien**

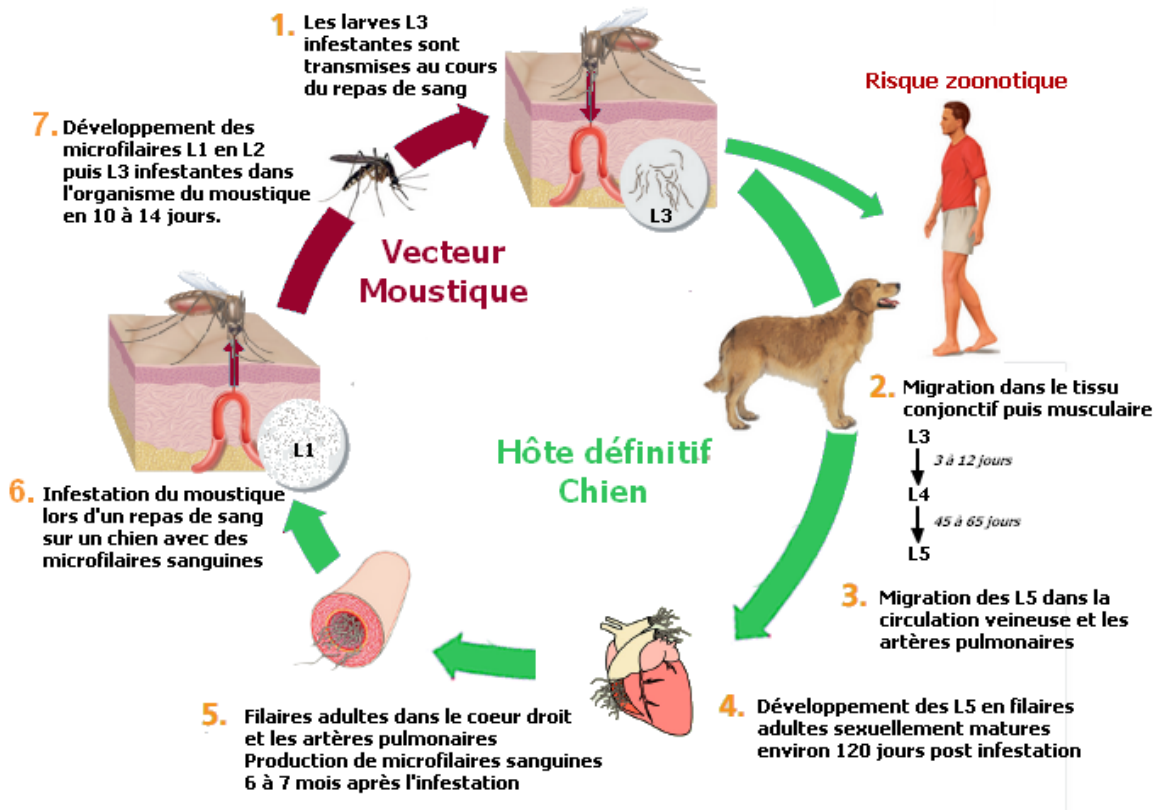


Figure 20 : Représentation schématique du cycle de *Dirofilaria immitis* élaborée d'après un schéma issu de l'article de Genchi et al. 2013

b) *Dirofilaria repens*

Les filaires adultes de *Dirofilaria repens* se localisent entre le tissu sous-cutané et les tissus conjonctifs profonds du chien. Les microfilaires sont libérées dans la circulation sanguine.

L'hôte définitif est le chien mais le chat, le renard le lion peuvent aussi être infestés, de même que l'homme. Les chiens constituent le principal réservoir ; les chats et les carnivores sauvages étant rarement microfilarémiques (Ducos de Lahitte. 1990).

Les hôtes intermédiaires sont les mêmes que pour *Dirofilaria immitis* : il s'agit d'arthropodes diptères de la famille de Culicidés appartenant aux genres *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*, *Armigeres*, *Ochlerotatus*, et *Coquillettidia*. Dans des conditions expérimentales, il a été démontré que *Dirofilaria repens* est capable de se développer chez les mêmes espèces et aux mêmes températures que *Dirofilaria immitis* (Genchi et al. 2009).

Le moustique femelle s'infeste lors d'un repas sanguin sur un animal porteur de microfilaires L1. L'évolution en larve L3 infestante dans l'organisme du moustique dure 8 à 13 jours pour une température optimale de développement de 28-30°C, 10-11 jours à 26°C, 16 à 20 jours à 22°C et n'est pas possible à des températures inférieures à 19°C (Genchi et al. 2009).

Les larves infestantes L3 de *Dirofilaria repens* pénètrent la peau du chien lors du repas de sang du moustique via l'effraction cutanée provoquée par la piqûre. Elles n'effectuent qu'une courte migration dans le tissu sous-cutané et se transforment en larves L4 qui atteignent leur maturité en 6 à 9 mois et deviennent alors des adultes. Les filaires adultes sont retrouvées sur l'ensemble du corps, entre le tissu sous-cutané et les tissus conjonctifs plus profonds et peuvent parfois être à l'origine de nodules.

La période pré-patente est de 6,5 mois à 9 mois. Les microfilaires se développent dans l'utérus des filaires adultes femelles fécondées et sont ensuite libérées dans le sang périphérique capillaire et veineux de l'hôte. La durée de vie des filaires adultes est de 5 à 7 ans (Anderson. 2000).

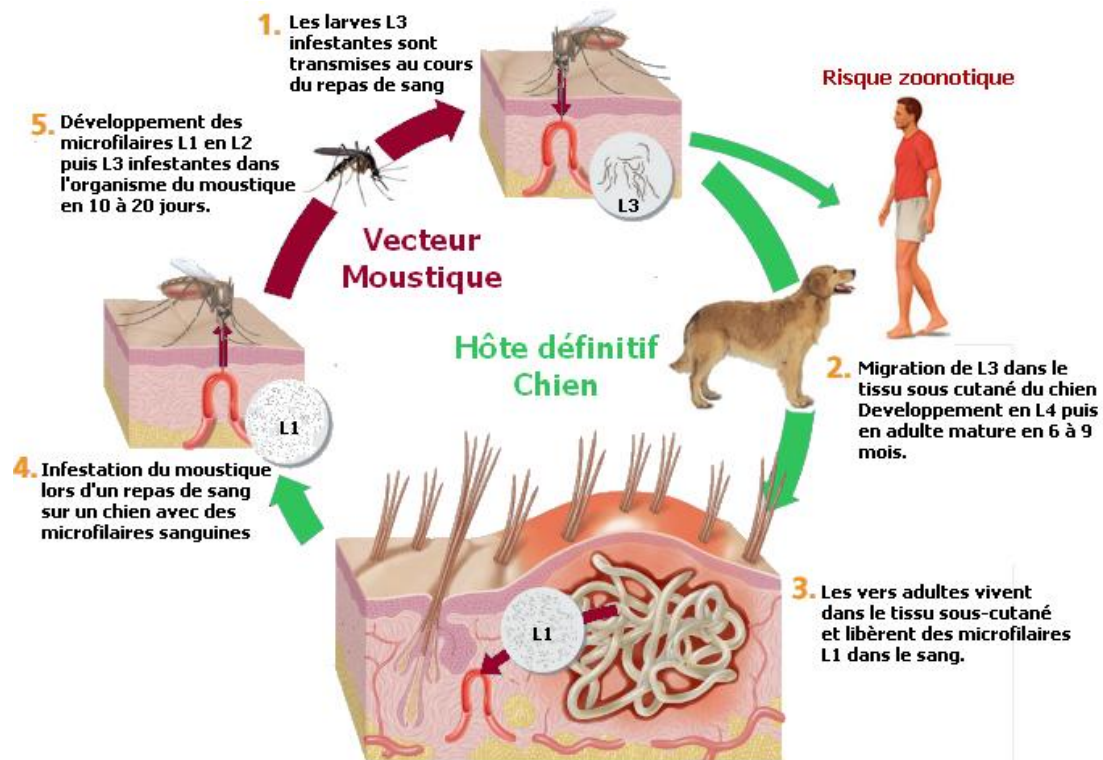


Figure 21 : Représentation schématique du cycle de *Dirofilaria repens* élaborée d'après un schéma issu de l'article de Genchi et al. 2013

c) *Acanthocheilonema reconditum*

Acanthocheilonema reconditum est une filaire du chien qui peut aussi parasiter d'autres espèces de carnivores tels que le renard, le chacal, le coyote ou la hyène. Il semblerait que le chat ne soit pas réceptif et aucun cas d'infestation féline n'a été documenté. Le potentiel zoonotique est faible avec un seul cas humain décrit à ce jour (Huynh et al. 2001).

Chez l'hôte définitif carnivore, les vers adultes sont retrouvés dans le tissu conjonctif sous-cutané et plus rarement dans le tissu adipeux péri-rénal. Les microfilaries L1 sont libérées dans le courant circulatoire périphérique.

Contrairement aux espèces du genre *Dirofilaria*, les hôtes intermédiaires d'*Acanthocheilonema reconditum* ne sont pas des moustiques mais des puces appartenant aux espèces *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Pulex irritans*, *Pulex stimulans*, *Echidnophaga gallinacea* et des poux : *Heterodoxus spiniger*, *Linognathus setosus*.

La puce *Ctenocephalides felis* est considérée comme le principal vecteur. Le rôle de la tique *Rhipicephalus sanguineus* comme vecteur de cette espèce de filaire a longtemps été envisagé mais est aujourd'hui écarté (Napoli et al. 2014).

Les microfilaires L1 sont ingérées pendant le repas de sang. Le développement en larves L3 infestantes chez la puce *Ctenocephalides felis felis* expérimentalement infectée nécessite 15 jours.

À la différence des larves de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* chez le moustique, la présence de larves d'*Acanthocheilonema reconditum* n'aurait aucune conséquence sur la survie de la puce (Napoli et al. 2014). Des analyses histologiques ont montré que les larves étaient incorporées dans les muscles de l'extrémité distale de l'abdomen de la puce à proximité des corps adipeux. La localisation extra-digestive et la taille importante des larves L3 infectieuses (environ $1150 \times 28 \mu\text{m}$) suggère que la transmission par voie buccale est peu probable. L'hypothèse avancée actuellement concernant la transmission au chien est qu'elle se ferait plutôt par ingestion de la puce infestée que par transmission au cours d'un repas de sang.



Figure 22 : Coupes histologiques d'une puce infestée par *A. reconditum* colorées à l'hématoxyline et à l'éosine
 (A) Les sites anatomiques sont : B=cerveau, G=ganglions thoraciques, M=Intestins, R=ampoule rectale, F=corps gras
 (B) 13 jours post-infection: la flèche indique la coupe transversale d'une larve L2
 (C) Agrandissement de (B) avec la flèche indiquant la coupe transversale d'une larve L2
 d'après Napoli et al. 2014

Le cycle évolutif est beaucoup moins connu que celui des espèces du genre *Dirofilaria* : des études ont montré que la période pré-patente au terme de laquelle des microfilaires sont

observées sur des chiens infectés expérimentalement est de 67 à 101 jours mais aucune information complémentaire n'est disponible sur des animaux naturellement infestés (Napoli et al. 2014).

d) Acanthocheilonema dracunculoïdes

Acanthocheilonema dracunculoïdes est une filaire du chien et de certains carnivores sauvages tels que le renard roux *Vulpes vulpes* et des espèces de hyènes africaines : la hyène tachetée *Crocuta crocuta* et le protèle *Proteles cristatus* (Schwan et Schröter. 2006).

Chez ces carnivores qui jouent le rôle d'hôtes définitifs, les vers adultes sont hébergés dans la cavité péritonéale, et de manière plus anecdotique, dans la cavité thoracique.

Les femelles sont vivipares et produisent des microfilaries sanguines après une période pré-patente de 4 mois. La longévité des adultes n'est pas connue et les microfilaries ne semblent obéir à aucune périodicité.

Les hôtes intermédiaires identifiés sont les tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus* et les mouches *Hippobosca longipennis* (Olmeda-García et al. 1993).

Les microfilaries L1 sont ingérées pendant le repas de sang et évoluent en larves L2 puis en larves L3 qui s'accumulent dans les appendices buccaux des arthropodes. Les chiens s'infestent lors des repas sanguin. Le trajet de migration des larves chez le chien et les stades de développement sont inconnus (Schwan et Schröter. 2006).

e) Cercopithifilaria spp.

D'après nos connaissances actuelles, les espèces *Cercopithifilaria bainaie*, *Cercopithifilaria grassii* et *Cercopithifilaria sp.II* ne sont rencontrées que chez le chien qui joue le rôle d'hôte définitif.

La filaire adulte est retrouvée dans le tissu conjonctif sous-cutané. La période pré-patente de ces filaires est de moins de 6 mois.

Les microfilaries produites par les vers adultes ne sont pas sanguines mais dermiques : elles sont distribuées inégalement dans les tissus du derme des chiens infestés et sont surtout présentes sur la tête, les oreilles et le cou (Otranto et al. 2012).

Les hôtes intermédiaires sont les tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus*. Il faut souligner que les régions où les microfilaires sont abondantes (tête, oreilles et cou) correspondent aux zones où ces tiques sont classiquement fixées pour prendre leur repas sanguin. Une hypothèse raisonnable serait alors que les larves L3 infestant le chien n'effectuent pas de migration majeure et que les adultes qui en découlent libèrent les microfilaires dans les mêmes régions anatomiques (Otranto et al. 2012).

Les tiques, au stade nymphal ou adulte, s'infestent avec des microfilaires L1 au moment du repas sanguin. Les larves de *Cercopithifilaria* s'y développent environ 30 jours avant d'atteindre le stade L3 infestant (Ramos et al. 2014).

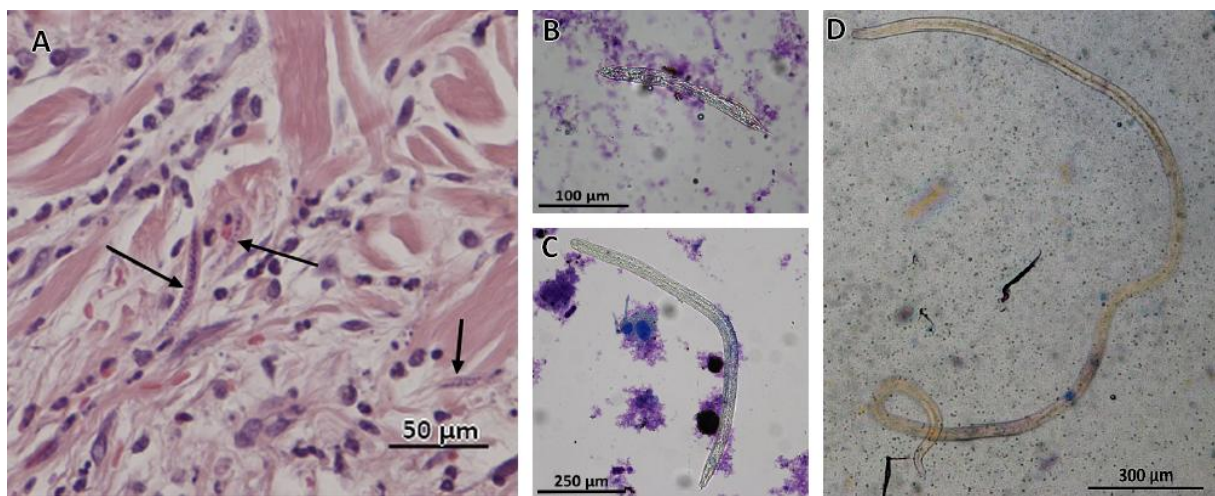


Figure 23 : (A) Coupe histologique du derme où des microfilaires (indiquées par les flèches) ont été détectées par biopsie cutanée; (B) (C) (D) Larves de *Cercopithifilaria* sp. II provenant de tiques disséquées (B) Stade L1, (C) Stade L2, (D) Stade L3
D'après Otranto et al. 2012

f) *Onchocerca lupi*

Onchocerca lupi est un parasite retrouvé au niveau du tissu péri oculaire chez le chien et le loup (espèce chez qui il a été décrit initialement) et plus rarement chez le chat et chez l'homme.

Son cycle évolutif reste mal connu et les données actuelles s'appuient principalement sur l'hypothèse qu'il serait semblable à celui des autres espèces du genre *Onchocerca*.

Dans les cas d'onchocercose canine, des filaires mâles adultes, des femelles gravides et une importante charge en microfilaires sont observées, ce qui suggère que les chiens peuvent constituer les hôtes définitifs de ce parasite.

Les hôtes intermédiaires pourraient être des simulies de l'espèce *Simulium reptans* (Diptère, Simuliidés) et/ou des *Culicoides* (Diptère, Cératopogonidés). L'infestation des vecteurs par les parasites du genre *Onchocerca* réduirait leur durée de vie et leur fécondité.

Les périodes pré-patentes des autres espèces du genre *Onchocerca* sont longues, de plusieurs mois à plusieurs années, ce qui laisse supposer qu'il en serait de même pour *Onchocerca lupi* (Sréter et Széll. 2008).



Figure 24 : Photographies de *Simulium reptans* (à gauche) et d'un *Culicoïde* (à droite)
Crédit Illustration : Google Images

5) La bactérie *Wolbachia pipientis*, symbiote des filaires

a) Présentation générale

Wolbachia pipientis est une alpha-protéobactérie intracellulaire obligatoire, Gram négative, appartenant à l'Ordre des Rickettsiales. Elle est symbiote de certaines espèces d'arthropodes et de nématodes et est nécessaire à leur survie et à leur reproduction. Elle est sensible aux antibiotiques de la famille des Tétracyclines.

La bactérie *Wolbachia pipientis* a été identifiée pour la première fois dans les tissus reproducteurs du moustique *Culex pipiens* en 1924 par Hertig et Wolbach. Elle a été transmise aux nématodes par les arthropodes vecteurs au cours de l'évolution.

Elle infecte aujourd'hui 40% des espèces d'arthropodes et 47% des espèces de filaires de la famille des Onchocercidés (LePage et Bordenstein. 2013). Toutes les espèces de filaires pathogènes sont infestées par *Wolbachia* : sa présence a ainsi été décrite chez *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* et *Onchocerca lupi*.

La transmission de la bactérie est essentiellement verticale : elle est transmise du ver femelle à sa descendance via le cytoplasme des ovocytes.

b) Symbiose entre les bactéries et les filaires

Les bactéries du genre *Wolbachia* sont indispensables au développement, à la survie et à la reproduction des filaires. Leur élimination chez leur hôte symbiotique conduit à une inhibition de la croissance des stades larvaires, à une stérilité des vers femelles par blocage de l'embryogenèse précoce et à la mort de certains vers adultes (McCall et al. 2008 ; Slatko et al. 2010).

La nature de cette symbiose fait encore l'objet de recherches mais il semblerait que la bactérie fournisse des éléments nutritifs essentiels pour les filaires (tels que la flavine adénine dinucléotide et la riboflavine). Il a aussi été suggéré qu'elle serait capable de produire de l'énergie et des métabolites de la même manière que des mitochondries (LePage et Bordenstein. 2013).

c) *Wolbachia* et *Dirofilaria immitis*

Dirofilaria immitis fait partie des espèces de nématodes qui hébergent les bactéries *Wolbachia pipientis* et ce, à tous les stades de développement.

Les colonies se retrouvent principalement au niveau des cordes hypodermiques latérales des parasites mâles et femelles, ainsi qu'au niveau du tractus génital femelle. Elles sont abondantes chez les microfilaires et dans une moindre mesure chez les femelles sexuellement matures qui produisent ces larves (McCall et al. 2008).

Wolbachia présente des protéines de surface (WSP) qui jouent le rôle d'antigènes et sont capables de déclencher chez le chien une réponse immunitaire humorale de type Th-1 : il y a alors production d'immunoglobulines et synthèse de cytokines immunomodulatrices et pro-inflammatoires (Morchón et al. 2012). Néanmoins, la bactérie n'est exposée au système immunitaire de l'hôte qu'après la mort des vers et plus particulièrement des microfilaires qui sont les principales sources de *Wolbachia* chez les chiens infestés. La mort d'un grand nombre de microfilaires fait suite à un traitement larvicide ou à des réactions d'hypersensibilité par le système immunitaire de l'hôte.

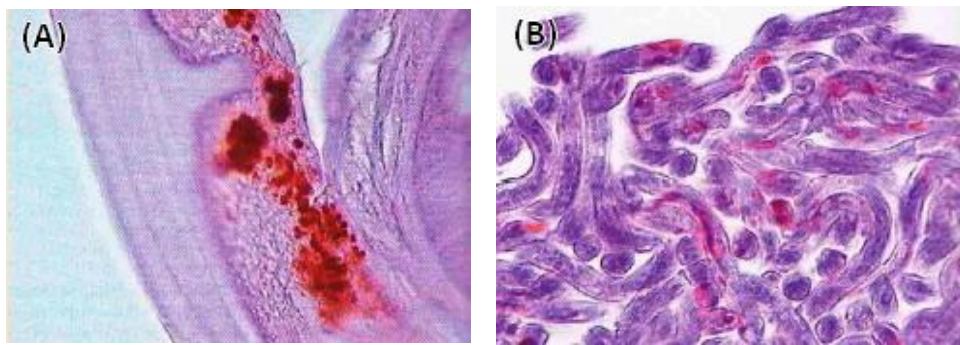


Figure 25 : Mise en évidence de protéines de surface de *Wolbachia* (WSP) par immuno-histochimie
(A) Dans les cordes hypodermiques latérales d'une filaire adulte femelle
(B) A l'intérieur des microfilaires hébergées dans l'utérus d'une femelle adulte
D'après August. 2010

Des techniques d'immunohistochimie ont permis de mettre en évidence la présence de la bactérie *Wolbachia* dans des tissus de chiens atteints de dirofilariose cardio-pulmonaire grâce à la détection de ses protéines de surface WSP. Ces tissus correspondent à des organes dans lesquels circulent les microfilaires tels que le rein, le foie et les poumons.

Une étude menée récemment en Espagne indique que l'infection par *Wolbachia* augmente la sévérité des signes cliniques de la dirofilariose (Tabar et al. 2013) et favorise l'accumulation des neutrophiles dans les glomérules rénaux et la paroi des artères pulmonaires.

L'élimination des *Wolbachia* à l'aide d'un traitement à base de doxycycline réduit les effets indésirables liés au traitement adulticide et est donc recommandée au préalable (cf Partie III).

6) *Dirofilaria immitis*, agent de la dirofilariose cardio-pulmonaire

a) Épidémiologie de la dirofilariose canine à *Dirofilaria immitis*

La dirofilariose cardio-pulmonaire canine est une maladie à répartition mondiale, rencontrée sur tous les continents dans les régions à climat tropical et tempéré du globe : en Amérique, en Asie, en Europe méridionale, en Afrique, en Australie ainsi que dans les îles du Pacifique. La zone d'enzootie touche principalement les régions côtières et fluviales (Villeneuve. 2014).

L'aire de répartition de la filaire est étroitement liée à celle des moustiques vecteurs. Par conséquent, la distribution et la prévalence de la dirofilariose canine sont en constante évolution depuis une dizaine d'années car les changements climatiques actuels ont augmenté leur aire de répartition. L'extension de la maladie est également influencée par la densité de la population canine, les traitements préventifs mis en place et le déplacement des chiens infestés, réservoirs de microfilaires. Il faut aussi considérer le fait que la maladie fait plus souvent l'objet de recherche de nos jours, en particulier à cause de son potentiel zoonotique.

Dirofilaria immitis est retrouvée sur l'ensemble du continent américain. Aux États-Unis, la prévalence globale est estimée à 1,3% selon une étude menée entre 2010 et 2012 (Little et al. 2014).

La dirofilariose canine est endémique dans une bande côtière de 300 km de large allant du New Jersey jusqu'au Texas et bordant le fleuve Mississippi et ses principaux affluents. La prévalence chez le chien dans la vallée du Mississippi peut atteindre 45 à 60%. De nouveaux foyers ont été documentés depuis le début des années 2000 dans des états du centre et de l'ouest des Etats-Unis. La Figure 26 ci-dessous illustre l'extension de la maladie entre 2001 et 2013.

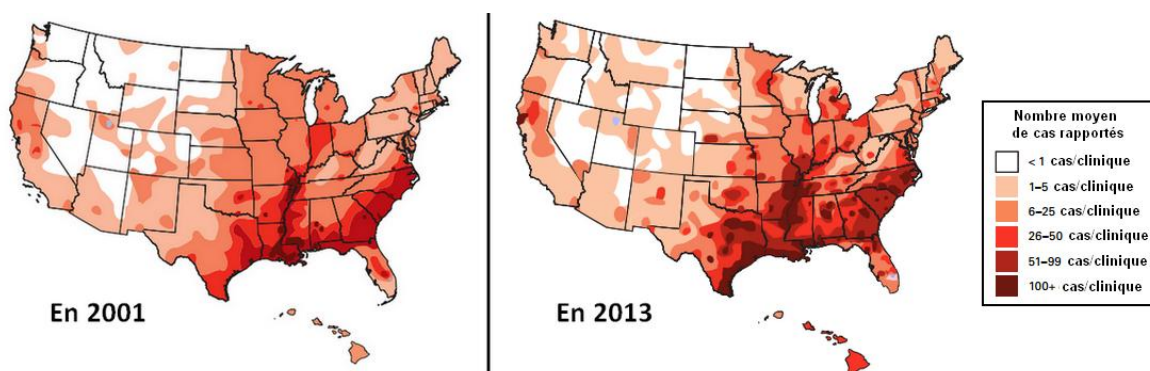


Figure 26 : Cartes indiquant le nombre moyen de cas de dirofilariose à *Dirofilaria immitis* recensés par clinique vétérinaire aux Etats-Unis en 2001 et en 2013, d'après le site web de l'American Heartworm Society (AHS)

Il faut considérer le rôle des canidés sauvages tels que les coyotes dans la transmission de la dirofilariose canine aux Etats-Unis. Ils sont en effet des hôtes compétents pour le parasite et sont largement distribués en Amérique du nord. La prévalence de *Dirofilaria immitis* dans les populations de coyotes peut atteindre 70% selon une étude réalisée en Californie et publiée en 2004 par Sacks et al. Ces canidés sauvages constituent alors des réservoirs majeurs de la dirofilariose.

Le Canada est beaucoup moins affecté par cette maladie avec une prévalence rapportée de 0,24% à l'échelle du pays mais elle peut atteindre 8,4% dans le sud de l'Ontario. La dirofilariose canine est enzootique dans les Caraïbes avec des prévalences rapportées allant de 20,4% à 63,2% (Simón et al. 2012). Elle est décrite également en Amérique centrale et en Amérique du Sud.

En Europe, la tendance actuelle est une extension de *Dirofilaria immitis* vers les pays du Nord et du centre du continent qui étaient autrefois considérés comme indemnes du parasite. Ainsi, ce parasite est enzootique en Espagne, aux îles Canaries, au Portugal, dans le sud-est de la France, le sud de la Suisse, en Italie, sur la côte Adriatique de l'Italie à la Grèce, en République Tchèque, en Slovaquie, en Roumanie, en Bulgarie et en Turquie. Il faut noter que les zones d'enzootie de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* se chevauchent dans plusieurs pays d'Europe et que ces deux espèces coexistent dans les mêmes régions, d'où l'intérêt d'établir un diagnostic différentiel lors de la détection de microfilaries sanguines.

En France, la prévalence de la dirofilariose canine à l'échelon national a été estimée à 0,22% dans une étude publiée en 2009 par Pantchev et al. Une recherche d'antigènes de *Dirofilaria immitis* a été effectuée sur 919 chiens provenant de toute la France et deux prélèvements ont donné des résultats positifs, les chiens atteints provenant uniquement de Corse et des Bouches-du-Rhône.

Les DOM-TOM tels que la Martinique, la Guadeloupe, la Guyane, la Nouvelle Calédonie, la Réunion et la Polynésie française constituent des zones d'endémie sévère. En Nouvelle-Calédonie, la prévalence a été évaluée à 22,4% dans une étude menée sur 49 chiens errants publiée en 2011 (Watier-Grillot et al. 2011).

Ainsi, sur des chiens présentant des signes cliniques compatibles avec la dirofilariose cardio-pulmonaire et résidant dans des régions où la maladie n'est pas classiquement rencontrée, il faut envisager la possibilité de déplacement dans des zones d'endémie, en particulier dans les DOM-TOM ou aux États-Unis.

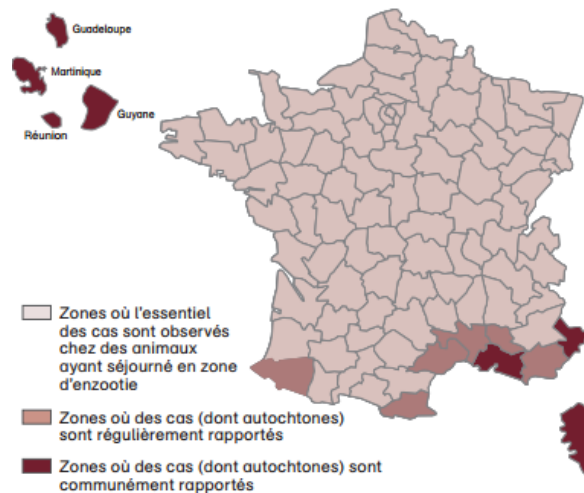


Figure 27 : Répartition géographique des cas de dirofilariose cardio-pulmonaire des carnivores en France d'après Bourdeau et al. 2008

En Afrique, très peu d'études épidémiologiques sur la dirofilariose canine ont été menées : quelques cas sont signalés au Maroc, en Tunisie, en Egypte, en Tanzanie, au Kenya, au Mozambique, au Malawi, au Sénégal, en Angola, au Gabon, au Nigeria et au Sierra Leone (Simón et al. 2012). Néanmoins, le parasite y est sans doute plus abondant que ce que ces quelques études isolées le laissent entendre.

En Asie, *Dirofilaria immitis* est retrouvé en Iran, en Inde, en Malaisie, en Corée du Sud, à Taiwan et au Japon. En Australie, ce parasite est endémique le long des côtes et dans les régions de l'Est.

La répartition géographique de *Dirofilaria immitis* s'est largement étendue ces dernières années, le parasite étant aujourd'hui décrit dans des régions autrefois considérées comme indemnes. Cette tendance devrait se confirmer à l'avenir sous les effets du réchauffement climatique qui rendent les habitats plus appropriés à l'introduction et à l'établissement des moustiques vecteurs.

b) Pathogénie de la dirofilariose cardio-pulmonaire

Dirofilaria immitis présente un pouvoir pathogène à tous les stades évolutifs. Ce sont principalement les filaires adultes qui sont responsables de l'évolution chronique classique de la maladie. De par leur action irritative sur la paroi des artères pulmonaires et obstructive de la lumière de ces artères, elles sont à l'origine d'une hypertension pulmonaire qui conduira, à terme, à une insuffisance cardiaque congestive droite.

i. Pathogénie de la forme chronique classique de la dirofilariose cardio-pulmonaire

▪ Action mécanique des filaires adultes et immatures

Les filaires adultes et immatures sont localisées dans l'artère pulmonaire et ses ramifications ainsi que dans le ventricule droit pour les adultes. Ils sont à l'origine d'une inflammation permanente de l'endocarde et de l'endartère dont l'importance pathologique est corrélée au nombre de vers.

Les lésions initiales concernent les artères pulmonaires, en particulier l'artère du lobe caudal droit qui est plus large et plus facile d'accès. La migration des vers immatures et adultes entraîne une hyperplasie endothéliale associée à une diminution du diamètre des vaisseaux (endartérite), une perte d'élasticité de la paroi et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Le passage d'albumine, de plasma et de cellules sanguines dans l'espace péri-vasculaire est alors facilité, stimulant la myoprolifération des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire (Bowman et Atkins. 2009).

Il en résulte la formation de villosités intravasculaires (« endartérite proliférative pulmonaire ») qui réduisent le diamètre de la lumière et la compliance artérielle et favorisent la formation de thrombi.

Cette obstruction luminale partielle augmente la résistance à l'écoulement du sang et entraîne une hypertension pulmonaire, dont l'intensité sera proportionnelle à la charge parasitaire. Il en résulte une augmentation de la post-charge avec une surcharge barométrique au niveau du cœur droit qui entraîne une hypertrophie concentrique du ventricule droit puis de l'oreillette droite. Ces remaniements vont mener au développement d'une insuffisance cardiaque droite. Les perturbations hémodynamiques peuvent mener à une insuffisance rénale de type pré-rénale.

Les lésions vasculaires précédemment décrites augmentent la perméabilité et permettent ainsi le passage de fluides et de protéines dans le tissu interstitiel pulmonaire. Il en résulte une inflammation du parenchyme pulmonaire au cours de laquelle il y a activation de leucocytes et du complément et libération de cytokines, de radicaux libres et de médiateurs de l'inflammation. Les lésions de l'endothélium capillaire et de l'épithélium alvéolaire vont compromettre leur perméabilité pour l'eau et les protéines. Elles peuvent aboutir à la formation d'un œdème pulmonaire non cardiogénique lié à des lésions pulmonaires inflammatoires (Simón et al. 2012).

Lors de lésions à un stade avancé, la sclérose artérielle peut mener à la rupture d'artères pulmonaires et provoquer une hémorragie pulmonaire avec de l'hémoptysie. Ce type d'accident vasculaire se produit plus particulièrement lors d'effort physique du fait de l'augmentation du travail cardiaque.

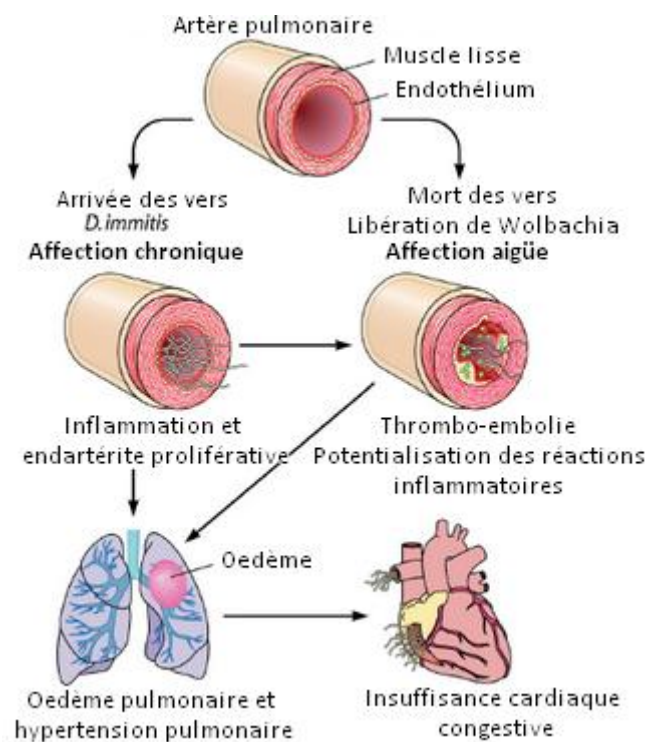


Figure 28 : Représentation schématique de la physiopathologie de la dirofilariose cardio-pulmonaire
D'après Simón et al. 2012

Lorsque les filaires meurent, naturellement ou à la suite d'un traitement adulticide, elles se décomposent et des fragments viennent se loger dans les artérioles pulmonaires distales et les lits capillaires dans les lobes pulmonaires caudaux, bloquant le flux sanguin. Ces fragments de vers associés à l'inflammation suscitée et l'agrégation plaquettaire génèrent des thrombo-embolies pulmonaires dont l'issue peut être fatale (Dillon et al. 1995).

Occasionnellement, des localisations ectopiques de *Dirofilaria immitis* sont rapportées : des vers adultes peuvent être retrouvés dans la chambre antérieure de l'œil, le foie, la peau, le système nerveux central et la cavité péritonéale. Cela s'explique par le fait que des larves ont effectué une migration aberrante, qu'elles sont restées piégées dans ces localisations et y ont évolué en adultes.

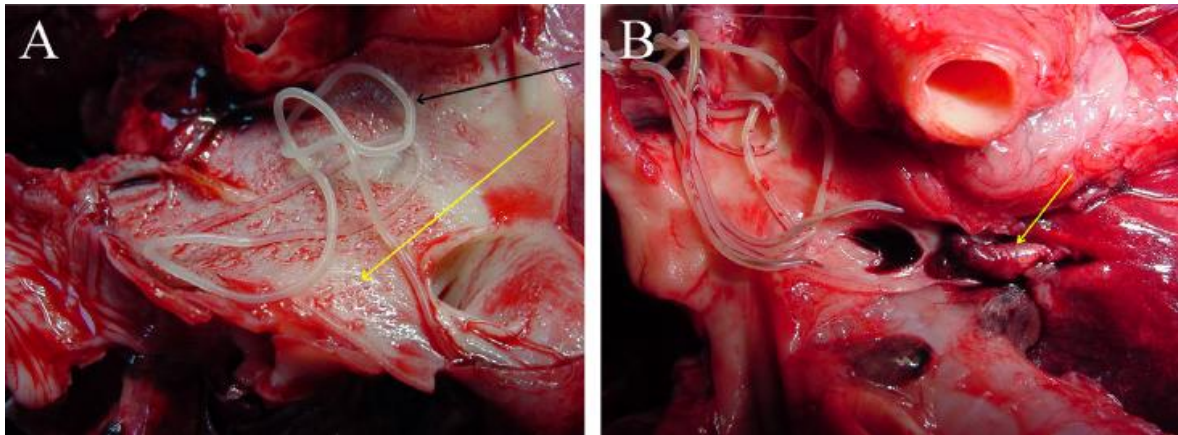


Figure 29 : Altérations pathologiques des artères pulmonaires associées à la dirofilariose cardio-pulmonaire
 (A) Surface d'endothélium vasculaire d'une artère pulmonaire d'un chien atteint montrant des villosités intravasculaires bien développées (flèche jaune) et la présence d'un ver adulte (flèche noire).
 (B) Thromboembolie (flèche jaune) dans une artère pulmonaire d'un chien.
 D'après Simón et al. 2012

- Action mécanique des microfilaires

Le rôle pathogène mécanique des microfilaires est relativement faible comparé à celui des adultes. Les microfilaires peuvent s'emboliser dans les capillaires cutanés et viscéraux et ainsi être à l'origine de lésions ischémiques localisées. Comme c'est le cas pour les vers adultes, les microfilaires mortes, détruites par un traitement microfilaricide en particulier, sont plus à risque d'entraîner une obstruction de la microvascularisation. Au niveau des capillaires cutanés, leur embolisation sera à l'origine de manifestations ulcéraives prurigineuses. Dans les reins ou le foie, elles peuvent former des microgranulomes.

- Actions antigénique et toxique

Les antigènes parasites sont propres à chaque stade évolutif. Les filaires adultes vivantes libèrent des antigènes métaboliques, produits de sécrétions et d'excrétion (antigènes DiE/S) dans la circulation sanguine qui sont recherchés pour le diagnostic de la maladie. Les microfilaires, présentes dans la circulation périphérique portent des antigènes cuticulaires susceptibles d'être directement reconnus par le système immunitaire de l'hôte. La mort des parasites (suite à un traitement adulticide ou microfilaricide ou lors de forme occulte) expose

les bactéries *Wolbachia* au système immunitaire de l'hôte et entraîne un relargage massif d'antigènes.

Ces antigènes, reconnus par le système immunitaire de l'hôte, sont susceptibles d'entraîner la formation de complexes immuns pathogènes par des réactions d'hypersensibilité de type III. Ces complexes se déposent au niveau de la membrane basale des glomérules rénaux d'une part et sur la paroi des artères pulmonaires d'autre part.

Le dépôt des complexes immuns sur la membrane basale glomérulaire entraîne l'activation du complément et le recrutement de neutrophiles à l'origine d'une inflammation chronique et de la destruction du glomérule rénal. Il en résulte un épaississement de la membrane basale glomérulaire, une prolifération des cellules mésangiales, un effacement du prolongement des podocytes et une nécrose capillaire. Il s'agit d'une glomérulonéphrite à immuns complexes ou glomérulonéphrite mésangio-proliférative. La capacité de filtration rénale diminue et la perméabilité capillaire augmente d'où des fuites protéiques et l'éventuel développement d'un syndrome néphrotique. Selon Paes-de-Almeida et al. 2003, ces lésions rénales sont principalement retrouvées chez des chiens avec une microfilarémie importante et c'est la présence des microfilaries dans les capillaires rénaux qui serait à l'origine de ce phénomène. En effet, le rôle pathogène des microfilaries dans la pathologie rénale est lié à la fois au dépôt d'immuns complexes dans les capillaires glomérulaires mais aussi à leur capacité à favoriser la formation de micro-thrombi dans ces capillaires. Il a également été démontré dans une étude de 2012 que les chiens avec des microfilaries circulantes présentent une protéinurie et un taux d'IgG anti-*Wolbachia* dans les urines plus importants que les chiens amicrofilarémiques (Morchón et al. 2012).

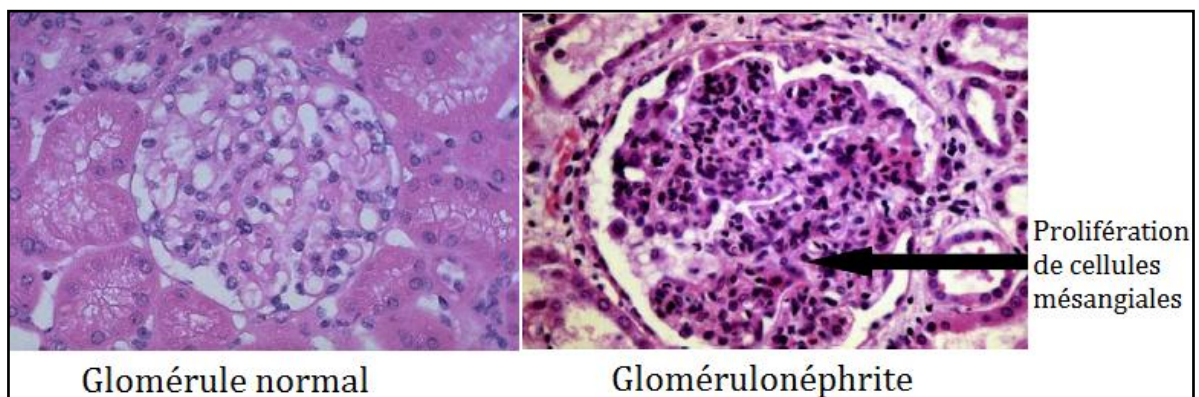


Figure 30 : Comparaison d'une coupe histologique d'un glomérule normal et d'un glomérule avec glomérulonéphrite à immuns complexes (d'après Cours ENVT – Immunologie A2)

Des lésions du parenchyme pulmonaire sont parfois décrites lors de dirofilariose cardiopulmonaire et sont plus fréquemment rapportées dans les formes occultes de la maladie. La

pneumonie éosinophilique est liée à la destruction des microfilaires dans les capillaires pulmonaires suite à la fixation d'anticorps à leurs antigènes cuticulaires. Elle est à l'origine d'un dysfonctionnement de la barrière alvéolo-capillaire et entraîne une détresse respiratoire sévère. Des granulomes éosinophiliques sont également retrouvés avec des microfilaires séquestrées par des cellules inflammatoires de type polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, macrophages et lymphocytes (Bowman et Atkins. 2009).

ii. Pathogénie du Syndrome de la Veine Cave

Le Syndrome de la Veine Cave est une complication rapportée lors d'infestation massive par des filaires adultes. Il fait suite à leur migration des artères pulmonaires vers le ventricule droit, l'atrium droit et plus rarement, vers la veine cave caudale (Bowman et Atkins. 2009).

Les vers vont s'enchevêtrer dans les cordages tendineux des valves tricuspides. Ils vont d'une part gêner leur fonctionnement mécanique et entraîner des régurgitations tricuspidiennes et d'autre part, créer des turbulences du flux sanguin à l'origine d'une hémolyse « mécanique » majeure dans les cavités cardiaques droites.

Il en résulte un état de choc cardiogénique menant à une insuffisance hépato-rénale liée à une hypoperfusion d'organes. L'hémolyse massive favorise les états d'hypercoagulabilité et, de fait la coagulation intravasculaire disséminée.

iii. Pathogénie de la forme occulte liée à la destruction immunologique des microfilaires

Certains chiens présentent une hyperréactivité de leur système immunitaire vis-à-vis des microfilaires : il s'agit de phénomènes d'hypersensibilité de type I retardée qui vont entraîner la destruction des microfilaires rapidement après leur libération du tractus génital des vers femelles. L'infestation est alors amicrofilarémique.

Dans cette forme particulière de dirofilariose occulte, une réponse humorale spécifique est dirigée contre les microfilaires circulantes : des anticorps anti-cuticulaires sont produits et entraînent leur immobilisation dans les capillaires pulmonaires ou rénaux. Elles sont ensuite séquestrées par des cellules inflammatoires et sont impliquées dans la formation de granulomes dans le parenchyme pulmonaire et rénal.

La mort des microfilaires entraînent la libération de bactéries du genre *Wolbachia* dont les protéines de surface WSP vont induire une réponse immunitaire de type Th-1 et permettre la

mise en place de réactions d'hypersensibilité de type III avec dépôts de complexes immuns au niveau de la paroi des artères pulmonaires (pneumopathie éosinophilique) et éventuellement au niveau des membranes glomérulaires rénales (glomérulonéphrite) (Calvert et Lonzonsky. 1985).

c) Étude clinique chez le chien

L'évolution clinique de la dirofilariose cardio-pulmonaire canine est le plus souvent chronique et la maladie n'est identifiée qu'à un stade avancée chez la plupart des chiens (Bowman et Atkins. 2009).

Les signes cliniques observés sont variables et dépendent de la charge parasitaire, de la localisation des vers mais aussi du niveau d'exercice du chien, de sa taille et de sa réponse immunologique à l'infestation, réponse propre à chaque hôte. Il s'agit d'une maladie protéiforme qui peut aboutir à de graves complications telles qu'une bronchopneumopathie éosinophilique, une thromboembolie pulmonaire, une glomérulonéphrite, un Syndrome de la Veine Cave, ou une Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD).

Le délai d'incubation est de 6 mois au minimum (durée qui correspond à la période de développement des larves L3 infestantes en filaires adultes) mais l'infestation peut rester asymptomatique pendant plusieurs années.

i. Forme classique = Forme chronique cardio-pulmonaire

La forme classique de la dirofilariose se décline en trois stades cliniques chez le chien, en fonction de la charge parasitaire et de l'avancée de la pathologie vasculaire et pulmonaire liée aux vers adultes.

• **Classe I = Forme fruste ou crypto-symptomatique**

Le chien est en bon état général et ne présente généralement aucun symptôme. Le propriétaire peut parfois rapporter de la toux ou une baisse du niveau d'activité. Les signes cliniques sont discrets et le diagnostic est difficile à établir à ce stade de la maladie (Curtis. 2015).

Lors de forme fruste, les lésions cardio-vasculaires sont mineures et le taux d'infestation parasitaire est faible. Les microfilaires sanguines sont absentes ou en faible nombre. Le résultat au test antigénique semi-quantitatif est faiblement positif. C'est cette forme qui est la plus fréquente en Europe puisque la pression d'infestation reste modérée même en zone dite endémique et les chiens infestés peuvent rester asymptomatiques pendant plusieurs années.

- **Classe II = Forme clinique modérée : Insuffisance cardiaque droite compensée**

Le nombre de vers adultes dans les artères pulmonaires est plus important et est directement en lien avec l'intensité de l'hypertension pulmonaire, responsable de l'hypertrophie du cœur droit et de son altération fonctionnelle (Curtis. 2015).

L'insuffisance cardiaque droite est d'abord compensée par une tachycardie et une augmentation de la puissance de contraction cardiaque.

Les signes cliniques de la maladie apparaissent progressivement. Les premiers signes chez le chien sont une intolérance à l'exercice, parfois accompagnée d'une toux sèche chronique, aggravée à l'effort. Un amaigrissement et une baisse de forme peuvent également être des signes d'alerte.

Chez les chiens peu actifs avec une charge parasitaire modérée, l'évolution de la maladie est lente et ce stade II peut durer plusieurs années (Bourdoiseau, 2000).

- **Classe III = Forme clinique sévère : Insuffisance cardiaque droite congestive décompensée**

Les symptômes décrits tendent à s'aggraver et l'état général de l'animal se dégrade.

La phase de décompensation de l'insuffisance cardiaque, qui correspond au moment où le cœur n'est plus capable de maintenir le débit cardiaque, arrive d'autant plus vite que l'animal a une activité physique intense.

La maladie aboutit à la présentation clinique d'une insuffisance cardiaque droite avec un tableau clinique qui peut inclure (Bowman et Atkins. 2009):

- Un amaigrissement
- Une fatigabilité à l'effort
- Une toux persistante
- Une dyspnée, suite à l'effort dans un premier temps puis au repos également. La détresse respiratoire augmente au fur et à mesure que la maladie progresse.
- Des syncopes
- De l'ascite, des œdèmes périphériques et des épanchements pleuraux ou péricardiques quand l'insuffisance cardiaque droite devient congestive
- Une hépatomégalie et une splénomégalie du fait de la stase veineuse qui est à l'origine d'une congestion viscérale. De même, une insuffisance rénale peut se

développer ainsi que des troubles digestifs secondaires à la congestion de la veine cave caudale.

- De l'épistaxis ou de l'hémoptysie liés à des hémorragies pulmonaires, qui, si elles sont sévères, peuvent aboutir à un choc hypovolémique

La mort subite est rare mais peut se produire suite à l'insuffisance cardio-respiratoire ou à une thromboembolie pulmonaire.

L'examen clinique peut révéler une pâleur des muqueuses, un pouls fémoral peu frappé, une distension des veines jugulaires. L'auscultation cardio-respiratoire est généralement modifiée avec des bruits respiratoires surajoutés, un souffle systolique apexien droit caractéristique d'une d'insuffisance tricuspidiennne, un dédoublement du second bruit cardiaque ou plus rarement un bruit de galop (Bowman et Atkins. 2009).

ii. Formes aiguës

▪ Syndrome de la Veine Cave (« Classe IV »)

Le Syndrome de la Veine Cave est une conséquence de l'évolution de la maladie chez des chiens non traités chez lesquels des vers adultes vont migrer vers le cœur droit et la veine cave caudale et vont entraîner des perturbations hémodynamiques.

Il s'observe lors d'une infestation massive par plus de 50 filaires adultes, le plus souvent sur des chiens de petit format. Il se caractérise par l'apparition brutale d'un état de choc cardiogénique avec une hémolyse intravasculaire qui peut entraîner une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

Les symptômes sont d'apparition brutale avec un abattement marqué, une anorexie, une dyspnée aigüe, une hémoglobininémie et une hémoglobininurie (Venco, 1993).

Les signes cliniques évocateurs d'un Syndrome de la Veine Cave sont les suivants (Bowman et Atkins. 2009) :

- Muqueuses pâles ; temps de remplissage capillaire anormal
- Pouls fémoral filant
- Distension des veines jugulaires avec un pouls jugulaire rétrograde
- Hépatomégalie liée à une congestion hépatique passive sévère
- A l'auscultation : tachycardie, souffle systolique apexien droit dans 87% des cas
- Ascite dans 29% des cas, ictère dans 19% des cas et hémoptysie dans 6% des cas

L'évolution clinique est fatale dans les 2 à 5 jours en l'absence d'une prise en charge adaptée incluant notamment l'extraction chirurgicale des filaires.

- **Forme thrombo-embolique**

Il s'agit d'une complication de la dirofilariose cardio-pulmonaire qui peut survenir de manière spontanée ou dans le mois qui suit l'administration d'un traitement filaricide.

- La thromboembolie pulmonaire

Elle résulte de l'obstruction d'une ou plusieurs artères pulmonaires par :

- Un thrombus, souvent suite à un Syndrome de la Veine Cave.
- Des fragments de filaires mortes (suite à un traitement adulticide) qui vont s'emboliser dans les ramifications des artères pulmonaires et constituer un obstacle à la perfusion pulmonaire.

Les thrombo-embolies pulmonaires ainsi formées se manifestent par l'apparition brutale de signes cliniques tels que de la dyspnée, de la tachypnée, de la toux, de l'hyperthermie ou de l'hémoptysie. Elles peuvent aboutir à un état de choc.

Elles surviennent généralement dans les 7 à 10 jours qui suivent le traitement adulticide mais des cas sont rapportés jusqu'à quatre semaines post-traitement (Villeneuve. 2014).

- La Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)

La CIVD fait suite à :

- La libération brutale d'antigènes parasitaires suite à la mort d'un nombre important de filaires (post-traitement filaricide par exemple)
- Une hémolyse intravasculaire massive dans le cas d'un Syndrome de la Veine Cave.

Dans un premier temps, un état d'hypercoagulabilité se met en place avec une activation anormale des mécanismes de la coagulation. Des micro-thrombi se forment dans la circulation capillaire et peuvent être à l'origine de lésions ischémiques locales. Parallèlement, le système fibrinolytique est activé, les plaquettes et les facteurs de la coagulation sont consommés et il y'a une libération massive de produits de dégradation de la fibrine (PDF) et du fibrinogène.

Il peut s'en suivre une phase d'hypocoagulabilité entraînant des hémorragies diffuses et incoercibles avec un chien qui peut présenter les signes suivants : saignements diffus avec des pétéchies ou du purpura au niveau de la peau et des muqueuses, épistaxis, hémoptysie,

saignements digestifs (méléna, hématurie, hématochésie) et urinaires (hématurie) ou hémorragies intracavitaires (hémothorax, hémopéritoine).

En l'absence d'une prise en charge adaptée, cette coagulopathie de consommation évolue vers la mort de l'animal.

- Les thrombo-embolies parasitaires

Les filaires adultes mortes peuvent s'emboliser dans les artères pulmonaires comme évoquée précédemment mais peuvent également obstruer d'autres vaisseaux et entraîner des lésions ischémiques.

Ce phénomène est décrit au niveau des capillaires glomérulaires, des capillaires sous-cutanés, de structures nerveuses ou encore des capillaires pulmonaires avec un cas rapporté de pneumothorax spontané (Oliveira et al. 2010).

De la même manière, les parasites peuvent s'emboliser au niveau des artères iliaques conduisant à une myopathie ischémique au niveau des membres postérieurs (Guillot. 2008).

iii. Forme occulte liée à la destruction immunologique des microfilaries

Dans cette forme particulière de dirofilariose occulte, les chiens sont infestés par des vers adultes fertiles mais ne présentent pas de microfilarémie car les microfilaries sont détruites par le système immunitaire de l'hôte.

Les signes cliniques observés sont principalement des signes respiratoires : ils sont liés à l'existence d'une pneumonie éosinophilique qui mène à un dysfonctionnement alvéolaire, à une hypoxémie et une hypoxie à l'origine d'une détresse respiratoire sévère (Bowman et Atkins. 2009).

iv. Formes atypiques

▪ **Forme oculaire**

La forme oculaire de la dirofilariose résulte d'une migration erratique de *Dirofilaria immitis* à l'issue de laquelle des formes immatures se retrouvent dans le corps vitré ou dans la chambre antérieure de l'œil du chien, avec une atteinte le plus souvent unilatérale. Cette forme reste anecdotique puisque seulement une vingtaine de cas ont été décrits à ce jour à travers le monde, principalement au Japon, aux États-Unis et en Australie mais aussi en Europe pour la première fois en 2009 (Dantas-Torres et al. 2009).

Les signes cliniques associés sont des signes de conjonctivite avec un bléphasmasme et une photophobie, un œdème cornéen et une procidence de la membrane nictitante. Dans les cas les plus sévères, un glaucome par uvéite hypertensive peut s'observer.

Le diagnostic est aisé quand la filaire se trouve dans la chambre antérieure de l'œil : elle apparaît à l'examen ophtalmoscopique comme un filament blanchâtre mobile ondulant dans l'humeur aqueuse et est parfois associée à la présence d'un sac fibrineux blanchâtre. Dans ce cas, le pronostic est bon et le traitement consiste en une extraction du parasite. Lors de localisation intra-vitréenne, la visualisation du parasite est plus difficile et est facilitée dans le cas où la filaire est vivante du fait de sa mobilité.

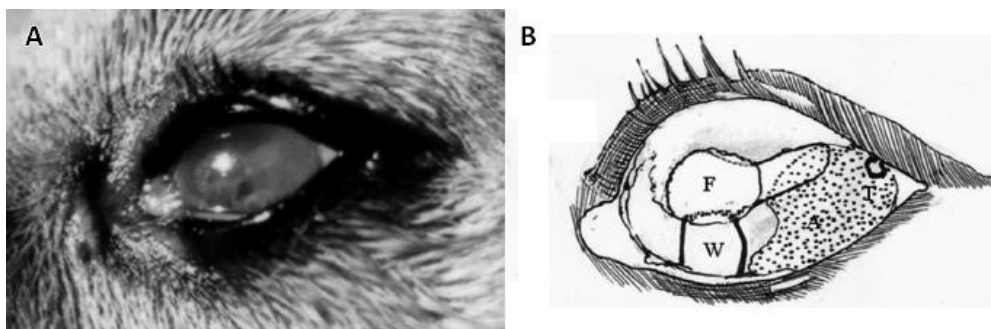


Figure 31 : Forme oculaire de la dirofilariose à *Dirofilaria immitis*, d'après Hayasaki et al. 2013
(A) : Photographie de l'œil gauche d'un chien avec des filaires et un exsudat fibrineux dans la chambre antérieure
(B) : Schéma représentant l'œil de ce même chien : A : Adhérence entre le cristallin et l'iris, F : Sac de fibrine, T : Perforation de l'iris, W : filaire.

• **Forme neurologique**

Les signes nerveux liés à *Dirofilaria immitis* sont extrêmement rares. Ils sont la conséquence d'une embolisation de vers adultes, voire de microfilaries dans les vaisseaux du système nerveux central (Patton et Garner. 1970).

Les signes cliniques sont variables en fonction de la localisation de la lésion. Des localisations médullaires entraînent une incoordination motrice, une parésie ou une paraplégie. Une atteinte cérébrale avec des troubles hypoxiques va plutôt provoquer des troubles comportementaux, un port de tête anormal, une marche en cercle, une amaurose ou des crises épileptiformes.

Notons que des syncopes peuvent résulter directement de l'insuffisance cardiaque qui est à l'origine d'une hypoxie cérébrale.

• **Formes cutanées**

Les lésions cutanées lors de dirofilariose à *Dirofilaria immitis* sont rares et sont le plus souvent imputables aux microfilaries. Des cas de migration erratique de filaires en région sous-cutanée à l'origine d'abcès ou de kystes ont également été rapportés (Coles et al. 1988).

La dermatite microfilarienne résulte de l'obstruction des capillaires cutanés par les microfilaires. Elle peut se manifester par des lésions de nécrose cutanée ou par des lésions alopeciques ulcératives prurigineuses, principalement dans les régions à peau fine telles que les oreilles, les doigts ou le ventre (Mozos et al. 1992).

d) Eléments d'orientation de biologie clinique

i. Lors de forme classique de la dirofilariose

Les modifications biochimiques fréquemment rencontrées lors de dirofilariose sont répertoriées dans le Tableau 2 ci-dessous (d'après Bowman et Atkins. 2009) :

Tableau 2 : Modifications biochimiques fréquemment rencontrées lors de dirofilariose à *Dirofilaria immitis*

Marqueurs de l'inflammation	Augmentation des protéines totales avec une hyperglobulinémie
Marqueurs de cytolyse et de cholestase hépatique	Augmentation des ALAT, ASAT ; PAL, GGT dans 10% des cas
Marqueurs de la fonction rénale	Augmentation de la créatinine et de l'urée dans 5% des cas

Lors d'insuffisance cardiaque congestive, la stase veineuse est à l'origine de congestion hépatique («foie cardiaque») et peut aboutir à une augmentation des paramètres hépatiques.

L'azotémie témoigne d'une atteinte de la fonction rénale. Dans l'évolution classique de la maladie, il s'agit d'une insuffisance rénale d'origine pré-rénale qui rétrocede généralement bien après perfusion.

Les modifications hématologiques fréquemment rencontrées lors de dirofilariose sont répertoriées dans le Tableau 3 ci-dessous (d'après Bowman et Atkins. 2009) :

Tableau 3 : Modifications hématologiques fréquemment rencontrées lors de dirofilariose à *Dirofilaria immitis*

Numération formule	Anémie non régénérative modérée (chez 10% des chiens avec des formes modérées et jusqu'à 60% des chiens classe III)
	Neutrophilie, éosinophilie (85% des cas), basophilie (60% des cas)
	Thrombocytopénie

Une protéinurie est détectable dans 10 à 30% des cas dès le stade II de la maladie et est plus marquée au stade III avec l'évolution de l'insuffisance rénale. Lors de glomérulonéphrite à immuns complexes, la protéinurie sera très importante, indépendamment de l'avancée de l'atteinte cardio-pulmonaire.

ii. **Lors de Syndrome de la Veine Cave**

Les modifications hématologiques fréquemment rencontrées lors de Syndrome de la Veine Cave sont répertoriées dans le Tableau 4 ci-dessous (d'après Bowman et Atkins. 2009) :

Tableau 4 : Modifications biochimiques et hématologiques fréquemment rencontrées lors de Syndrome de la Veine Cave

Biochimie	Augmentation des protéines totales avec une hyperglobulinémie Hypoalbuminémie lors de protéinurie importante Augmentation de la créatinine et de l'urée Augmentation des ALAT, ASAT Augmentation des PAL, GGT
Numération formule	Anémie hémolytique sévère (ht<20%) Neutrophilie, éosinophilie, basophilie Thrombocytopénie
Frottis sanguin	Présence de schizocytes, acanthocytes, sphérocytes et codocytes
Analyse d'urine	Hémoglobininurie Protéinurie, bilirubinurie dans 50% des cas

e) **Anomalies des images radiographiques, échocardiographiques et de l'électrocardiogramme lors de dirofilariose cardio-pulmonaire**

i. **Les images radiographiques thoraciques lors de dirofilariose**

La radiographie thoracique permet de confirmer une atteinte cardio-pulmonaire et d'estimer les répercussions liées à la présence de filaires de *Dirofilaria immitis* dans le cœur droit et les artères pulmonaires. Elle est intéressante pour le diagnostic mais aussi pour le pronostic de la maladie et pour évaluer le risque de complications après un traitement adulticide (Rawlings, 1986). Des radiographies thoraciques sous deux incidences (face et profil) sont nécessaires.

Les signes radiographiques caractéristiques de la maladie sont les suivants :

- Élargissement des artères pulmonaires qui apparaissent déformées, irrégulières et parfois interrompues : les premières modifications artérielles sont communément observées dans la portion terminale de l'artère pulmonaire lobaire caudale droite. Elles s'étendent ensuite à l'intégralité de l'artère lobaire caudale droite, à l'artère lobaire crâniale droite et parfois au tronc pulmonaire qui apparaît alors élargi.
- Aspect anormal du parenchyme pulmonaire avec des aires de densification pulmonaire (opacification interstitielle et alvéolaire) dues aux thromboses et à la fibrose pulmonaire. Lors de dirofilariose avancée, ces lésions parenchymateuses sont parfois suffisamment importantes pour masquer l'arbre vasculaire (Guillot, 2008).
- Cardiomégalie droite avec d'abord une dilatation du ventricule droit à laquelle s'ajoute une dilatation de l'oreillette droite à un stade avancé de l'infestation. Sur la radiographie de profil, une augmentation de la surface de contact entre le cœur et le sternum et une trachée repoussée dorsalement sont observés.

Tableau 5 : Description des anomalies radiologiques selon le stade d'évolution de la dirofilariose cardio-pulmonaire

Classe I Forme fruste	Classe II Forme modérée	Classe III Forme sévère
Absence de lésions radiographiques radio-visibles	<ul style="list-style-type: none"> - Élargissement modéré des artères pulmonaires des lobes caudaux - Opacification péri-vasculaire alvéolaire et interstitielle du parenchyme pulmonaire, principalement au niveau des lobes caudaux et à droite - Dilatation du ventricule droit 	<ul style="list-style-type: none"> - Élargissement du tronc pulmonaire - Déformation et élargissement des artères lobaires caudales et crâniales - Perte de l'arborisation artérielle (interruption brutale et non effilée des artères pulmonaires) - Opacification alvéolaire et interstitielle diffuse du parenchyme pulmonaire (compatibles avec une thromboembolie pulmonaire ou une pneumonie allergique) - Cardiomégalie droite

Il est important de souligner qu'il n'existe pas de corrélation directe entre l'importance des anomalies radiographiques observées et le nombre de vers adultes présents dans les artères pulmonaires et le cœur droit.

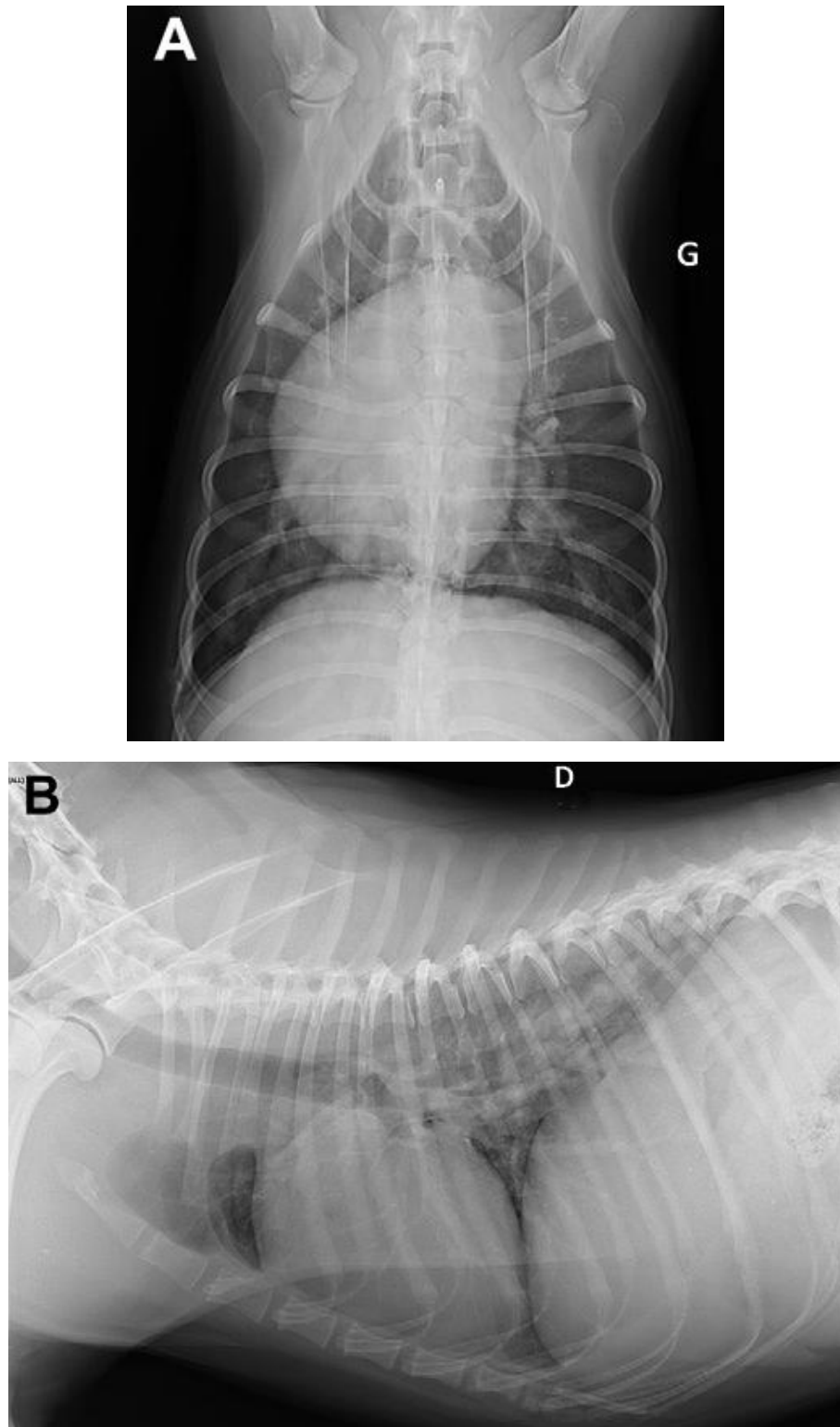


Figure 32 : Radiographies thoraciques d'un chien atteint de dirofilariose cardio-pulmonaire
(A) Incidence ventro-dorsale : Cardiomégalie droite avec dilatation du ventricule droit et de l'oreillette droite. Elargissement et aspect tortueux des artères pulmonaires des lobes caudaux.
(B) Incidence latérale droite : Cardiomégalie droite avec augmentation de la surface de contact entre le cœur et le sternum. Elargissement et aspect tortueux des artères pulmonaires.

D'après Bowman et Atkins. 2009

ii. Les images échocardiographiques lors de dirofilariose

L'échocardiographie est utilisée pour évaluer la structure et la fonction cardiaque par la visualisation des cavités cardiaques et des gros vaisseaux mais elle permet également l'observation directe des parasites dans le cœur droit et la vascularisation pulmonaire. Elle aide ainsi à préciser l'état d'avancement de la maladie et à estimer approximativement la quantité de filaires.

En début d'infestation, les parasites immatures se localisent principalement dans la portion terminale de l'artère pulmonaire lobaire caudale droite et les répercussions cardiaques sont nulles. L'intérêt de l'échocardiographie est alors très limité.

Les filaires adultes occupent des portions plus proximales de l'artère pulmonaire jusqu'au ventricule droit.

Progressivement, une hypertrophie concentrique du ventricule droit se met en place et est visible à la radiographie et à l'échocardiographie.

L'hypertension pulmonaire liée à l'obstruction des artères pulmonaires par les filaires et aux lésions artérielles prolifératives est objectivable à l'échocardiographie. Les signes échocardiographiques associés sont : une dilatation du ventricule droit (d'abord hypertrophique puis atrophique), une dilatation de l'artère pulmonaire principale et de ses ramifications, une dilatation de l'atrium droit, des mouvements paradoxaux du septum, un aplatissement systolique du septum, une diminution du diamètre interne du ventricule gauche et un changement du flux artériel pulmonaire (Guillot. 2008).

L'observation directe des filaires adultes est possible si elles sont situées dans des régions anatomiques accessibles aux ultrasons : les cavités du cœur droit, le tronc pulmonaire, les portions proximales des artères pulmonaires droites et gauches et la partie distale de la veine cave caudale (Simón et al. 2012). Elles apparaissent sous la forme de deux lignes hyperéchogènes parallèles, flottant dans les cavités du cœur droit ou dans la lumière des gros vaisseaux. Les structures hyperéchogènes correspondent aux parois du ver, riches en collagène, qui leur confèrent leur échogénicité.

Chez les chiens qui présentent une hémoglobinurie, la visualisation des parasites au niveau de la valve tricuspide permet de confirmer l'existence d'un Syndrome de la Veine Cave (Curtis. 2015).

Une échographie abdominale peut être envisagée pour exclure la présence de filaires dans des sites ectopiques.



Figure 33 : Images échocardiographiques d'un chien atteint de dirofilariose cardio-pulmonaire. Noter la présence de deux filaires adultes qui apparaissent comme deux lignes hyperéchogènes parallèles. Crédit photographique : cal.vet.upenn.edu/project

iii. L'électrocardiographie (ECG)

L'électrocardiographie mesure l'activité électrique du cœur et permet de détecter d'éventuels troubles du rythme cardiaque. Les arythmies sont rares chez les chiens atteints de dirofilariose cardio-pulmonaire (2 à 4% des cas) et s'observent principalement lors de Syndrome de la Veine Cave ou chez des animaux à des stades très avancés de la maladie qui présentent une cardiomégalie droite majeure (Bowman et Atkins. 2009). Les anomalies observées sont une augmentation de l'amplitude de l'onde P caractéristique d'une dilatation atriale droite ou une fibrillation atriale (absence d'onde P, QRS supraventriculaires).

f) **Potentiel zoonotique de *Dirofilaria immitis***

Dirofilaria immitis est responsable d'une forme pulmonaire de la dirofilariose chez l'homme avec la formation de nodules pulmonaires.

L'homme se contamine par le biais d'une piqûre d'un moustique vecteur de larves L3. Il constitue un cul-de-sac épidémiologique pour le parasite : les larves n'atteignent jamais le stade adulte et la production de microfilaries circulantes est impossible. Les larves L4 sont bloquées et détruites dans les artérioles pulmonaires et induisent la formation de nodules, visibles à la radiographie.

L'infestation humaine est le plus souvent asymptomatique. Seul un petit nombre de patients présentent des symptômes qui sont non spécifiques : toux, douleurs thoraciques, hémoptysie, fièvre et dyspnée peuvent être observées (Simón et al. 2012).

Les lésions nodulaires résultant de l'enkystement des larves dans les poumons sont généralement une découverte radiographique fortuite. Classiquement, un seul nodule pulmonaire droit est décrit, il apparaît homogène avec un contour bien défini. On parle de « pneumonie en pièce de monnaie ». Le diagnostic différentiel doit être établi avec des lésions d'origine néoplasique.

Le diagnostic définitif repose sur l'exérèse chirurgicale et l'identification histologique du parasite (diamètre, épaisseur de la cuticule, distribution des fibres musculaires), voire l'identification par analyse moléculaire (PCR).



Figure 34 : Radiographie thoracique d'un homme montrant un nodule pulmonaire attribué à *Dirofilaria immitis*
D'après Simón et al. 2012

Des cas d'infestation sous-cutanée par *Dirofilaria immitis* ont également été décrits (Foissac et al. 2013).

7) Pouvoir pathogène de *Dirofilaria repens* et des autres filaires parasites du chien

a) *Dirofilaria repens*

Dirofilaria repens est la principale espèce impliquée dans les cas de dirofilariose sous-cutanée du chien en Europe. Notons que des microfilaires d'autres espèces peuvent également être responsables de troubles cutanés chez le chien, notamment les microfilaires de *Dirofilaria immitis* ou les microfilaires dermatotropes.

L'infestation par *Dirofilaria repens* est généralement asymptomatique chez le chien malgré la microfilarémie. Quand des signes cliniques cutanés associés sont observés, ils sont soit dus aux formes adultes, soit aux microfilaires qui s'embolisent dans les capillaires sanguins.

Un article publié en 2011 par Walter Tarello recense 100 cas de chiens ayant présenté des signes cliniques liés à l'infestation par *Dirofilaria repens* entre 1990 et 2010 et provenant d'Allemagne, de République tchèque, de Hongrie, d'Ukraine, de Russie, d'Autriche, de Suisse, de France, des Pays-Bas et du Moyen-Orient. Les signes cliniques observés étaient les suivants : prurit (100%), érythème (79%), papules (62%), alopecie focale ou multifocale (55%), hyperkératose (18%), croûtes (14%), nodules (12%), eczéma (3%), pyodermite (3%) et œdème (1%). De plus, 85% des chiens avaient au moins une lésion sur la partie postérieure du corps (région lombo-sacrée, membres postérieurs, région péri-anale).

▪ Pouvoir pathogène des adultes et signes cliniques

Très rarement, les filaires adultes peuvent être à l'origine d'une dermatose nodulaire : des nodules sous-cutanés indolores et prurigineux dans lesquels sont enkystés les vers adultes sont alors observés à la surface du corps des chiens infestés, principalement au niveau du tronc.



Figure 35 : Photographies de chien atteints de dirofilariose sous-cutanée causée par *Dirofilaria repens*.
A gauche : nodule sous-cutané au scrotum - A droite : vers adultes visibles dans un nodule sous cutané.

Crédit photographique : Simón et al. 2012

▪ **Pouvoir pathogène des microfilaires et signes cliniques**

Dans certains cas, lors d'infestations massives et chez des animaux sensibilisés, les microfilaires présentes dans les capillaires sous-cutanés de la peau peuvent être à l'origine de lésions prurigineuses, de pustules, d'ulcérations ou de lésions évoquant la gale sarcoptique.

Pendant l'été et l'automne, le nombre de microfilaires circulants dans le sang est plus important, ce qui augmente les risques de manifestations cutanées. Les symptômes régressent par la suite et ont tendance à réapparaître de manière saisonnière entre le printemps et l'automne pendant la deuxième et la troisième année avant de devenir persistants après la quatrième année d'infestation (Tarello. 2011).

▪ **Diagnostic**

En pratique, le diagnostic d'orientation est basé sur la détection de microfilaires sanguines dont les caractéristiques morphologiques sont compatibles avec *Dirofilaria repens* associé à un test de détection des antigènes de *Dirofilaria immitis* négatif. Le diagnostic de certitude passe par la coloration histochimique ou la PCR, non disponible en routine.

▪ **Potentiel zoonotique**

L'aspect zoonotique de la maladie est majeur à considérer.

Dirofilaria repens entraîne une dirofilariose sous-cutanée chez l'homme. Les lésions sont dues à la présence de vers, le plus souvent immatures, dans le tissu sous-cutané qui entraînent la formation de nodules sous-cutanés.

Dans 30% à 35% des cas, il s'agit de lésions périorbitaires ou orbitaires, les parasites étant retrouvés au niveau des paupières, sous la conjonctive ou dans le corps vitré. Les symptômes associés sont locaux avec un blépharospasme, une ptose palpébrale et un inconfort oculaire. Chez 10% des patients apparaissent des complications à l'origine d'une perte d'acuité visuelle (détachement de rétine, glaucome, cataracte...) (Simón et al. 2012).

Ainsi, la détection de microfilaires sanguines chez le chien devrait motiver la mise en place d'un traitement même si aucun symptôme n'est observé pour éviter que l'animal ne serve de réservoir pour le parasite et pour diminuer le risque d'infestation humaine.

b) *Acanthocheilonema reconditum*

▪ Pouvoir pathogène des adultes et signes cliniques

La filaire adulte d'*Acanthocheilonema reconditum* n'a pas d'action pathogène connue chez le chien.

Une étude menée en 1983 par Lindemann et al. sur des chiens infestés expérimentalement a démontré que ce nématode n'entraînait aucune manifestation clinique bien que certains chiens parasités présentaient une leucocytose et une éosinophilie.

▪ Pouvoir pathogène des microfilaires et signes cliniques

Seules les microfilaires peuvent être à l'origine de troubles cutanés prurigineux et d'alopécie si elles sont très nombreuses.

L'importance clinique de ce parasite est surtout liée au risque de confusion de ses microfilaires avec celles de *Dirofilaria immitis*.

▪ Potentiel zoonotique

Acanthocheilonema reconditum n'est pas un parasite classiquement impliqué dans des infections zoonotiques. Un seul cas a été rapporté en 2001 en Australie où la filaire a été retrouvée dans un œil humain, en position sous-conjonctivale (Huynh et al. 2001).

c) *Acanthocheilonema dracunculoïdes*

▪ Pouvoir pathogène des adultes et signes cliniques

Les filaires adultes d'*Acanthocheilonema dracunculoïdes* sont communément considérées comme non pathogènes et sont le plus souvent découvertes de manière fortuite au cours d'une chirurgie abdominale. La présence d'un nombre important de filaires dans la cavité péritonéale pourrait en théorie entraîner de l'ascite par action mécanique mais ce phénomène n'a encore jamais été décrit.

Néanmoins, des cas d'épanchements pleuraux associés à une quantité importante de parasites adultes dans la cavité thoracique ont été signalés. Un cas de symptômes nerveux avec de l'ataxie et de l'incoordination motrice a été décrit chez un chien parasité en Espagne en 2002 (Bolio et al. 2002). L'hypothèse émise était alors que la migration des filaires aurait pu occasionner la compression de nerfs périphériques et ainsi expliquer les troubles neurologiques.

- **Pouvoir pathogène des microfilaires et signes cliniques**

Rodríguez (1990) a constaté qu'un nombre non négligeable de chiens qui présentaient un pelage sec et fragile associé à du prurit hébergeaient des microfilaires du genre *Acanthocheilonema*, principalement de l'espèce *Acanthocheilonema dracunculoides*.

Ainsi, les chiens infestés peuvent occasionnellement présenter des troubles cutanés liés aux microfilaires tels que du prurit, de l'alopecie, de l'érythème voire parfois des lésions ulcéraives. La pathogénie est mal connue mais un cas est décrit où des microfilaires périphériques ont été retrouvées au centre de microgranulomes situés dans les zones d'inflammation cutanée.

- **Potentiel zoonotique**

Cette filaire n'est pas considérée comme zoonotique.

d) Genre *Cercopithifilaria*

Les formes adultes des espèces du genre *Cercopithifilaria* n'ont pas de rôle pathogène rapporté chez le chien.

Les microfilaires n'entraînent généralement aucun symptôme chez les chiens infestés mais de rares cas de dermatoses diffuses avec prurit et érythème associé ont été décrits. Des analyses histologiques suggèrent qu'elles peuvent être à l'origine d'une dermatite interstitielle périvasculaire (Otranto et al. 2012).

En 2014, une publication de Gabrielli et al. a rapporté la présence de microfilaires de *Cercopithifilaria baina* dans le liquide synovial d'un chien souffrant de polyarthrite chronique (identification morphologique et moléculaire des parasites). Leur rôle pathogène n'est pas clairement élucidé d'autant plus que des traitements répétés avec de la milbémycine oxime n'avaient permis aucune amélioration clinique de l'animal.

Le potentiel zoonotique est considéré comme nul pour les espèces du genre *Cercopithifilaria* dans la mesure où aucun cas d'infestation humaine n'a encore été décrit.

Ainsi, même si cette filariose est le plus souvent asymptomatique, la détection de microfilaires dermiques fournit la preuve que le chien est exposé aux piqûres de la tique *Rhipicephalus sanguineus* et peut nous inciter à rechercher des affections vectorisées par celle-ci telles que la babésiose à *Babesia vogeli*, l'ehrlichiose à *Ehrlichia canis*, l'anaplasmosse à *Anaplasma platys* et l'hépatozoonose à *Hepatozoon canis*.

e) **Onchocerca lupi**

Onchocerca lupi est un parasite récemment reconnu causant des lésions nodulaires associées à une atteinte oculaire chez le chien qui peut être unilatérale ou bilatérale.

▪ **Pouvoir pathogène des adultes et signes cliniques**

Les symptômes observés en phase aiguë sont ceux d'une conjonctivite avec un épiphora, une douleur oculaire, une photophobie associée à une exophtalmie et un gonflement périorbitaire. Ces signes précèdent la formation d'un granulome ou d'un kyste autour des vers (Sréter et Széll. 2008). Un cas atypique a été décrit en 2016 où un vers adulte d'*Onchocerca lupi* a été retrouvé dans la chambre antérieure de l'œil d'un chien à l'origine d'une uvéite (Komnenou et al. 2016).

Dans les cas d'infestations chroniques, les vers sont incorporés dans des nodules granulomateux sous-conjonctivaux ou épiscléaux ou dans des kystes. Ces nodules sont situés dans le tissu péri-oculaire incluant l'espace rétrobulbaire, les fascias orbitaires, la membrane nictitante et les paupières. Leur surface est irrégulière du fait de l'enroulement des filaires adultes et des fragments filiformes de vers peuvent y être observés. Les signes cliniques associés incluent une exophtalmie, une hyperhémie conjonctivale, des écoulements oculaires, un gonflement périorbitaire, une douleur oculaire, une photophobie et un œdème cornéen. Certains cas peuvent se compliquer avec une blépharite, une uvéite antérieure ou postérieure ou un ulcère cornéen (Sréter et Széll 2008).



Figure 36 : Exemples d'atteintes oculaires liées à *Onchocerca lupi*

**(A) : Nodule sur la surface interne de la membrane nictitante
(B) : Nodule dans l'espace rétro-bulbaire ; (C) : Exérèse d'un nodule parasitaire (filaire visible)
Crédit photographique : Sréter et Széll. 2008**

L'exérèse chirurgicale du nodule révèle en général une infiltration profonde du tissu conjonctif péri-oculaire. L'examen histologique des nodules révèle que les filaires sont

entourées par un tissu conjonctif riche en collagène ou par un tissu granulomateux avec des éosinophiles, des histiocytes, des fibroblastes et des vaisseaux sanguins néoformés.

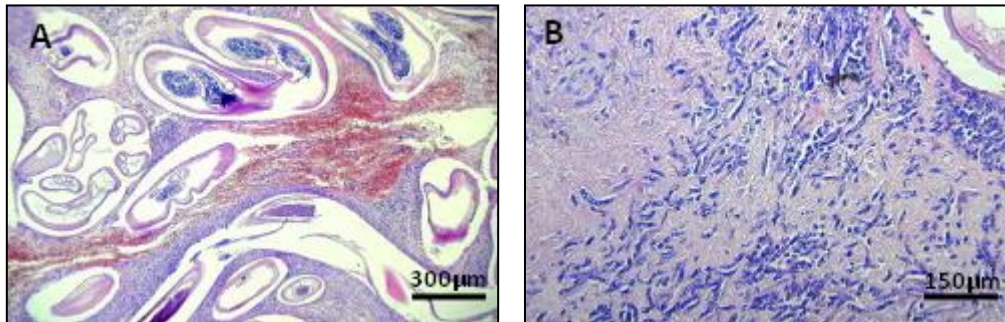


Figure 37 : Analyses histologiques de lésions d'onchocercose canine
 (A) Coupe histologique d'un nodule montrant plusieurs sections de filaires mâles et femelles gravides enroulées
 (B) Coupe histologique des tissus environnants mettant en évidence des microfilaries
 D'après Sréter et Széll. 2008

Le diagnostic peut être basé sur les caractéristiques de la structure de la cuticule des vers femelles et sur la taille et la morphologie des microfilaries (retirées de l'utérus de fragments de ver ou isolées de la peau d'un chien).

Cette parasitose doit être différenciée d'autres parasitoses à l'origine d'atteinte oculaire :

Tableau 6 : Espèces d'helminthes impliquées dans des affections oculaires chez le chien
 d'après Sréter et Széll. 2008

Espèce de parasite et stade de développement	Localisation oculaire du vers	Atteinte uni- ou bilatérale	Signes cliniques
<i>Thelazia</i> spp. (vers adultes matures)	Conjonctive	Bilatérale	Conjunctivite, Photophobie
<i>Onchocerca lupi</i> (vers adultes matures)	Sous-conjonctivale dans l'espace rétrobulbaire	Unilatérale ou bilatérale	Conjunctivite, Exophtalmie Gonflement périorbitaire
<i>Ancylostoma</i> sp. (vers adultes immatures)	Chambre postérieure	Unilatérale	Endophtalmie, glaucome
<i>Dirofilaria immitis</i> (vers adultes immatures)	Chambre antérieure	Unilatérale	Uveite, oedème cornéen, glaucome
<i>Angiostrongylus vasorum</i> (larves)	Chambre antérieure	Unilatérale ou bilatérale	Panuvéite, rétinopathie
<i>Toxocara canis</i> (larves)	Choroïde, rétine	Unilatérale ou bilatérale	Exophtalmie, Chorioretinite
<i>Trichinella</i> sp. (larves)	Paupières	Unilatérale ou bilatérale	Aucun

▪ **Pouvoir pathogène des microfilaries et signes cliniques**

Les microfilaries peuvent migrer dans le tissu cutané et entraîner des destructions tissulaires. Leur pathogénicité est d'autant plus marquée que leur nombre est important. Ils peuvent être à l'origine d'une dermatite éosinophilique se manifestant principalement par du prurit, une dermatite pustuleuse, voire de l'hyperkératose. Le diagnostic différentiel inclut principalement la gale, la pyodémodicose et les dermatoses allergiques.

▪ **Potentiel zoonotique**

Le potentiel zoonotique de cette filaire a été soupçonné pour la première fois en 2002 (Sréter et Széll. 2002) et a été confirmé par analyse moléculaire en 2011 chez une patiente en Turquie

(Otranto et al. 2011). Les nématodes sont retrouvés en position sous-conjonctivale de l'œil et les signes cliniques observés sont proches de ceux rencontrés chez le chien. La clinique est sensiblement la même avec la présence d'une masse péri-oculaire contenant un ver, le plus souvent immature.

II. Diagnostic expérimental des filarioses canines

Les données épidémiologiques et cliniques abordées précédemment sont primordiales dans la démarche diagnostique et permettent de suspecter une affection liée à *Dirofilaria immitis*.

Pour confirmer cette suspicion, plusieurs techniques sont disponibles. Elles consistent d'une part à mettre en évidence la présence de microfilaires sanguines et d'autre part à détecter les antigènes excrétés par les filaires femelles adultes. Il faut néanmoins être conscient que quelle que soit la méthode choisie, la détection de l'infestation n'est possible qu'en présence de filaires adultes et ne peut donc se faire qu'après 5 mois d'infestation au minimum pour les tests antigénémiques et après 6 mois pour la détection des microfilaires sanguines (Bowman et Manella. 2011).

1) Mise en évidence et identification des microfilaires

a) Mise en évidence des microfilaires sanguines

L'étalement sanguin à partir de sang capillaire périphérique est pratique mais il ne s'agit pas d'une méthode diagnostique de choix car sa sensibilité est insuffisante : il ne permet de détecter que 41,25% des chiens microfilarémiques (Ducos de Lahitte. 1990) et ne permet pas de différencier les différentes espèces.

Les microfilaires sont à rechercher sur les bords et les franges de l'étalement sanguin. Elles sont visibles sans coloration mais une coloration au May Grünwald-Giemsa (MGG) est recommandée pour apprécier leur morphologie de manière plus détaillée.

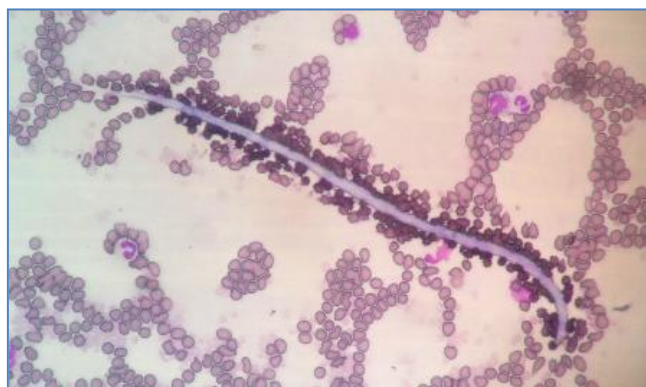


Figure 38 : Observation d'une microfilaire de *Dirofilaria repens* sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa à l'objectif x40. Crédit photographique : Julie Semat

L'observation de microfilaires lors de la réalisation d'un étalement sanguin sur sang périphérique peut également être une découverte fortuite du praticien dans le cadre de l'investigation d'une autre affection.

L'**examen direct d'une goutte de sang entre lame et lamelle** permet de détecter les microfilaires dans 2/3 des cas. A faible grossissement et sous lumière intense, des mouvements anormaux des hématies témoignent de la présence des microfilaires. Ces dernières seront observables à fort grossissement et avec le diaphragme fermé.

La **technique de la goutte épaisse** est comparable à l'examen précédent au niveau de sa sensibilité mais est plus longue à réaliser et est très peu utilisée en médecine vétérinaire.

Les protocoles décrits précédemment permettent de détecter une microfilarémie pour des infestations supérieures à 30 microfilaires par millilitre (Bowman et Manella. 2011).

Les méthodes qui donnent les meilleurs résultats sont la **méthode de Knott modifiée** qui est considérée comme la méthode de référence et la **méthode par filtration sur membrane**. Elles reposent sur l'examen d'une plus grande quantité de sang (1mL) après hémolyse, ce qui augmente la probabilité de détection du parasite. Elles permettent de détecter une microfilarémie à partir d'une seule microfilaire par millilitre. Leur sensibilité est comparable et est très correcte puisque ces deux méthodes permettent de détecter 93,75% des chiens présentant des microfilaires circulantes (Ducos de Lahitte. 1990).

La première étape pour ces deux techniques consiste en l'hémolyse de 1 mL de sang par mélange avec 9 mL d'une solution hémolysante (formol à 2%, acide acétique à 2%, saponines à 2%).

- Pour la méthode de Knott modifiée, le mélange est centrifugé à 3000 tours/minute pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est coloré au Bleu de Méthylène puis est observé au microscope avec le diaphragme fermé pour visualiser les microfilaires. Il s'agit de la technique de référence en termes de recherche de microfilaires circulantes.
- Dans la méthode par filtration, le sang hémolysé est filtré au travers d'une membrane filtrante de polycarbonate avec des pores de 3 µm de diamètre qui retient les microfilaires et laisse passer les diverses particules du sang. Le filtre est ensuite déposé sur une lame. Une goutte de fixateur-colorant peut y être ajoutée. L'observation microscopique permet la mise en évidence directe des microfilaires. L'efficacité de cette méthode est comparable à la précédente et sa réalisation est un peu plus rapide. Il existe des kits commerciaux dont le Filarassay® qui sera utilisé dans la partie expérimentale de cette thèse.

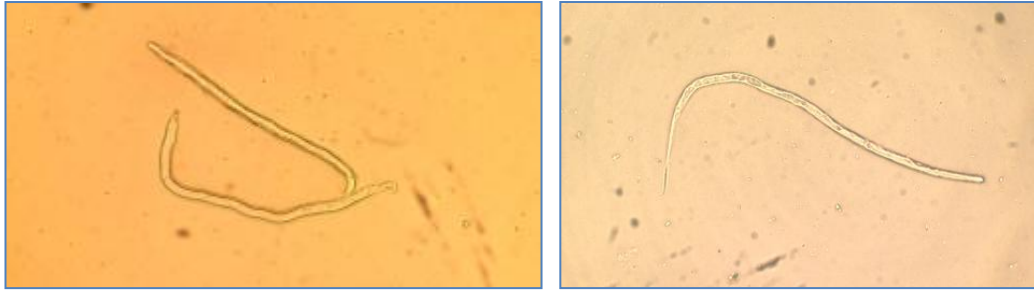


Figure 39 : Observation de microfilaries de *Dirofilaria immitis* (à gauche) et de *Dirofilaria repens* (à droite) sur filtre Filarassay® au grossissement x400. Crédit photographique : Julie Semat

b) Identification de l'espèce de microfilaries

L'observation de microfilaries par le biais d'une des méthodes décrites précédemment ne peut constituer à elle seule un diagnostic de certitude de la dirofilariose cardio-pulmonaire. Il existe quatre espèces de filaires qui produisent des microfilaries sanguines chez le chien : *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema reconditum* et *Acanthocheilonema dracunculoides*. Il est donc indispensable d'identifier l'espèce à laquelle appartiennent les parasites observés pour pouvoir conclure.

- Certains éléments peuvent nous orienter sur l'espèce mise en cause lors de l'observation des parasites au microscope optique (Ducos de Lahitte. 1990) :
 - L'observation des microfilaries vivantes et de leur manière de se déplacer peut être informative : les microfilaries d'*Acanthocheilonema reconditum* ont des mouvements vifs et se déplacent nettement en effectuant de grandes ondulations tandis que les microfilaries de *Dirofilaria immitis* ont tendance à se tortiller sur place.
 - La taille et la morphologie des microfilaries varient selon les espèces.
 - ✓ Les microfilaries du genre *Dirofilaria* sont généralement de plus grande taille que celles du genre *Acanthocheilonema*. Il faut néanmoins être prudent car la taille du parasite peut être modifiée de manière artéfactuelle par l'utilisation d'anticoagulants ou de colorants.
 - ✓ Les microfilaries de *Dirofilaria immitis* sont rectilignes, celles de *Dirofilaria repens* ont une queue légèrement incurvée tandis que celles de *Acanthocheilonema reconditum* ont une queue en crochet.

Les principales caractéristiques de chacune d'entre elles sont répertoriées dans le Tableau 7 qui suit :

Tableau 7 : Caractères morphologiques des microfaires sanguines rencontrées chez le chien
D'après Magnis et al. 2013 et Euzeby. 1990

Espèce de microfilaire	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dirofilaria repens</i>	<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	<i>Acanthocheilonema dracunculoïdes</i>
Longueur	290 - 330 µm	300 - 370 µm	260-280 µm	190 - 250 µm
Largeur	5 - 7 µm	6 - 8 µm	4 - 5 µm	4 - 6,5 µm
Enveloppe	Absente	Absente	Absente	Présente
Espace céphalique	Large, rectangle	Réduit, carré	Dent céphalique	Rectangle
Extrémité caudale	Queue droite avec l'extrémité effilée	Queue filiforme incurvée	Queue nettement recourbée en crochet	Queue pointue

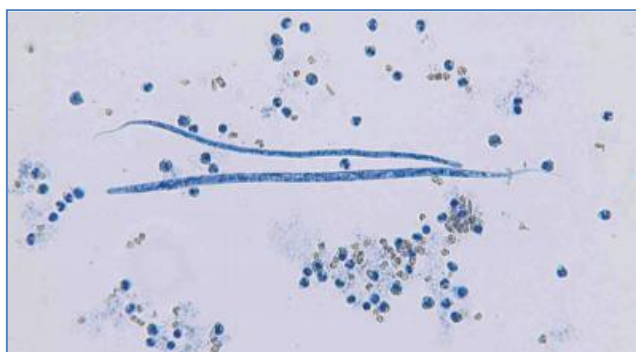


Figure 40 : Observation microscopique de microfaires d'*Acanthocheilonema reconditum* (en haut) et de *Dirofilaria immitis* (en dessous). Crédit photographique: Byron Blagburn, PhD

- Une étude morphologique plus précise a été proposée par le Professeur Ducos de Lahitte en 1990 et prend en compte la position des différents éléments anatomiques par rapport à la longueur totale de la microfilaire. Ces données sont présentées dans la Figure 41 et le Tableau 8.

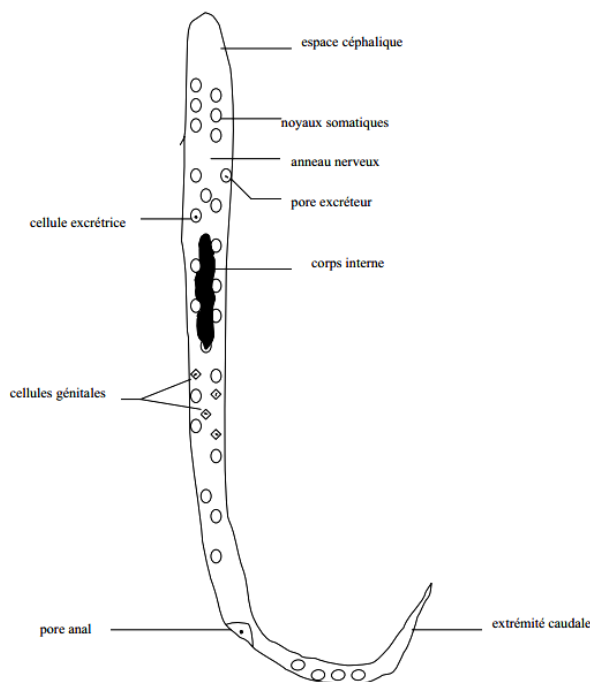


Figure 41 : Schéma anatomique d'une microfilaire
D'après Ducos de Lahitte 1990

Tableau 8 : Localisation des principaux éléments anatomiques des microfaires sanguines du chien en % par rapport à la longueur totale
D'après Ducos de Lahitte. 1990

Espèce de microfilaire	<i>Dirofilaria immitis</i>
Anneau nerveux	21,4 - 22,8
Pore excréteur	29,3 - 31
Cellule excrétrice	35 - 36,8
Pore anal	74,8 - 77,8
Dernier noyau somatique	90,9 - 92
Espèce de microfilaire <i>Dirofilaria repens</i>	
Anneau nerveux	20,1
Pore excréteur	29,2
Pore anal	75,7
Dernier noyau somatique	89,6
Espèce de microfilaire <i>Acanthocheilonema dracunculoïdes</i>	
Anneau nerveux	19,05 - 21,26
Pore excréteur	28,30 - 36,22
Pore anal	74,49 - 82,99
Dernier noyau somatique	89,88 - 95,50

Ainsi, il serait possible en théorie de mesurer les différents éléments en examen direct pour établir le diagnostic différentiel entre les différentes espèces de microfilaires.

Néanmoins, il existe en pratique une variation de taille importante selon les méthodes de fixation. De plus, ces mensurations doivent être prises sur plusieurs parasites dans le but d'avoir des valeurs moyennes : se pose alors le problème des infestations mixtes par plusieurs espèces.

- La méthode de la **coloration histochimique** par l' α -naphthol ASTR phosphate permet de mettre en évidence les zones d'activité phosphatasique acide sur les microfilaires. Ces zones, se traduisant par une coloration rouge brique, se situent à des endroits spécifiques pour chaque espèce.
 - ✓ Pour *Dirofilaria immitis*, il existe 2 zones d'activité phosphatasique acide au niveau du pore excréteur et du pore anal.
 - ✓ Pour *Dirofilaria repens*, 1 seule zone d'activité phosphatasique acide est présente au niveau du pore anal.
 - ✓ Pour *Acanthocheilonema reconditum*, la coloration des zones d'activité phosphatasique est diffuse sur l'ensemble du corps de la microfilarie.
 - ✓ Pour *Acanthocheilonema dracunculoides*, il existe 2 zones d'activité phosphatasique acide au niveau du pore excréteur et du pore anal, comme pour *Dirofilaria immitis* mais elles se différencient facilement par leur différence de taille, *Dirofilaria immitis* étant nettement plus grande.

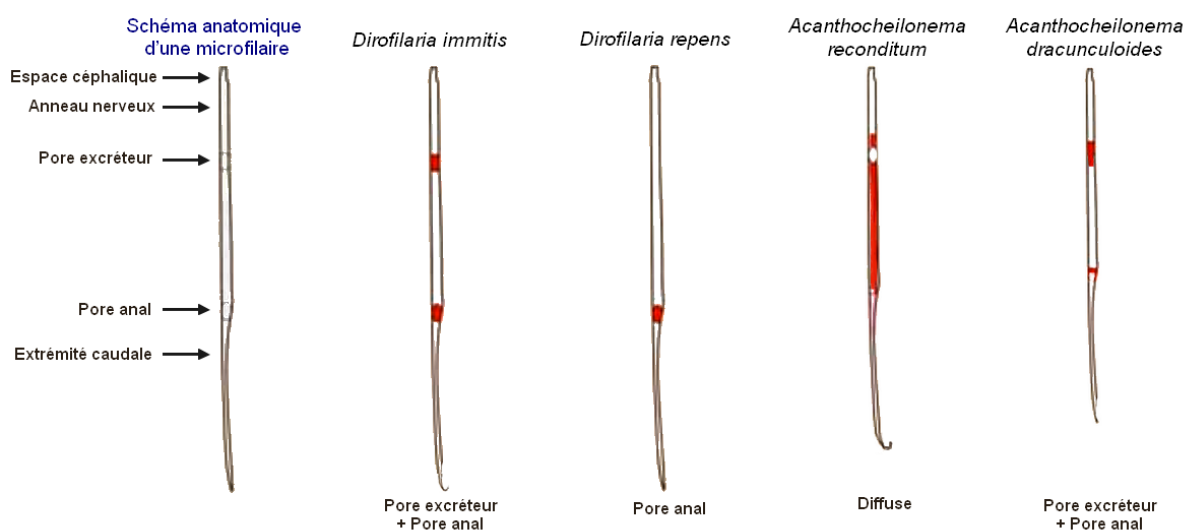


Figure 42 : Représentation schématique des zones d'activité phosphatasique acide des microfilaires D'après Schrey and Trautvetter. 1998



Figure 43 : Observation microscopique des microfilaries et de leurs zones d'activité phosphatasique acide au grossissement x400. D'après Schrey and Trautvetter. 1998

c) Limites des méthodes de détection des microfilaries sanguines

▪ **Manque de sensibilité : faux négatifs**

La sensibilité de ces méthodes de mise en évidence des microfilaries sanguines dépend de :

- La technique utilisée et des compétences de l'opérateur
- L'abondance des microfilaries dans le sang circulant
 - Il existe des cas d'infestations amicrofilarémiques. Cette situation est rencontrée chez 20 à 30% des chiens infestés (Schrey et Trautvetter. 1998) :
 - En période pré-patente d'une primo-infestation c'est à dire dans les 6 à 9 mois qui suivent l'infestation.
 - Lors d'infestations mono-parasitaires ou unisexes.
 - Lors de stérilité des adultes, suite à un traitement avec de la doxycycline ou des lactones macrocycliques.
 - Lors de cette forme particulière de dirofilariose occulte dans laquelle le système immunitaire détruit rapidement les microfilaries dès que les femelles les expulsent dans la circulation sanguine.
 - La période du prélèvement peut avoir un impact sur la quantité de microfilaries dans le sang. Pour *Dirofilaria immitis*, il existe une périodicité de la microfilarémie au cours de la journée, la densité maximale de microfilaries dans le sang périphérique étant atteinte en fin d'après-midi et en soirée (Ledesma et

Harrington 2011). Cette périodicité est corrélée à des facteurs extrinsèques tels que le comportement alimentaire des moustiques vecteurs mais aussi à des facteurs liés à l'hôte tels que le sommeil pendant lequel il semblerait que la microfilarémie dans les capillaires périphériques augmente (Di Cesare et al. 2013). L'idéal est donc de prélever les chiens en fin de journée, dans la mesure du possible, pour augmenter au maximum la sensibilité de notre recherche. Ces variations journalières n'empêchent pas toujours de poser un diagnostic, mais dans les cas où le nombre de microfilaires en circulation est très faible, des faux négatifs peuvent apparaître en fonction du moment du prélèvement.

- De plus, certaines publications suggèrent que dans le cas de co-infestation, la présence de *Dirofilaria repens* peut potentiellement entraîner une inhibition de la production de microfilaires par *Dirofilaria immitis* (Genchi et al. 1995).
- Rappelons qu'il n'y a pas de relation directe entre le nombre de microfilaires circulantes et le nombre de filaires adultes dans le cœur droit et les artères pulmonaires (Ducos de Lahitte. 1990).

▪ **Manque de spécificité : faux positifs**

Le manque de spécificité de ces techniques peut résulter de la confusion entre des débris vermiformes et des microfilaires mais aussi de l'interprétation erronée de l'observation de microfilaires.

En effet, la présence de microfilaires sanguines ne signifie pas obligatoirement l'existence d'une dirofilariose cardio-pulmonaire : il faut tenir compte de l'existence des autres espèces de microfilaires sanguines (*Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema reconditum*, *Acanthocheilonema dracunculoides*) qui sont le plus souvent non pathogènes. Il existe donc un réel intérêt à différencier ces espèces mais la méthode de coloration histochimique décrite précédemment est longue et fastidieuse et n'est pas réalisable en routine par un vétérinaire praticien.

Il existe aussi un risque de confusion avec des larves situées dans le tissu cutané et qui auraient été introduites de manière fortuite dans la seringue à cause de l'effraction cutanée au moment du prélèvement de sang. Il peut s'agir de microfilaires dermatropes des espèces des genres *Cercopithifilaria* et *Onchocerca* ou de larves cutanées des espèces *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Strongyloides stercoralis* ou *Rhabditis strongyloides*. Néanmoins, ces contaminations restent relativement rares et les larves sont souvent peu nombreuses. Pour les parasites gastro-intestinaux, un exemplaire unique est en général observé (suite à une méthode de concentration utilisant un millilitre de sang) et leur morphologie diffère de celle de *Dirofilaria*, en particulier du fait de leur taille, sensiblement plus importante (Villeneuve. 2014).

Tableau 9 : Caractères morphologiques des microfilaires sanguines, dermiques et des larves cutanées rencontrées chez le chien. D'après Sréter et Széll. 2008

	Espèces	Longueur (µm)	Largeur (µm)	Caractéristiques
Microfilaires	<i>D. immitis</i>	310 [290–330]	7,0 [6–8]	Absence d'enveloppe, queue droite
	<i>Dirofilaria repens</i>	325 [283–386]	7,0 [6–8]	Absence d'enveloppe, queue incurvée
	<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	248 [213–283]	4,5 [4–5]	Absence d'enveloppe, queue nettement recourbée en crochet
	<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	224 [190–258]	5,2 [4–6,5]	Présence d'enveloppe, queue droite
	<i>Cercopithifilaria grassii</i>	614 [567–660]	13,7 [12–15,5]	Présence d'enveloppe, queue légèrement incurvée
	<i>Onchocerca lupi</i>	108 [98–118]	6,0 [5–7]	Absence d'enveloppe, queue droite
Autres larves de nématodes	<i>Strongyloides stercoralis</i>	410 [228–600]	17,0 [8–26]	Absence d'enveloppe, queue droite
	<i>Rhabditis strongyloides</i>	550 [400–700]	21,0 [17–27]	Absence d'enveloppe, queue droite
	<i>Ancylostoma</i> et <i>Uncinaria</i> spp.	600 [500–700]	23,0 [22–24]	Absence d'enveloppe, queue droite

d) Mise en évidence des microfilaries dermatropes

Les espèces des genres *Cercopithifilaria* et *Onchocerca* libèrent des microfilaries dans le tissu cutané et jamais dans le système sanguin comme c'était le cas pour les espèces précédemment étudiées.

Ces microfilaries dermiques peuvent être détectées grâce à des biopsies de peau superficielle réalisées en région interscapulaire ou sur la tête du chien (Otranto et al. 2013). L'échantillon de peau (0,1 g) prélevé est déposé dans un tube contenant 500 µL de solution saline physiologique et est stocké à température ambiante pendant 2 à 4 h. L'échantillon de peau est ensuite retiré et le liquide restant est centrifugé à 350g pendant 3 minutes (Sréter et Széll. 2008). Le culot est observé au microscope photonique directement ou après fixation et coloration.

Les microfilaries d'*Onchocerca lupi* se caractérisent par leur déplacement lent et par leur petite taille (<120 µm), inférieure à celle de toutes les microfilaries ou les larves de nématodes que l'on pourrait retrouver dans la peau.

Néanmoins, la contamination sanguine accidentelle du matériel de biopsie lors du prélèvement est possible et il ne faut pas perdre de vue qu'il est possible de rencontrer des microfilaries sanguines.



Figure 44 : Microfilarie cutanée d'*Onchocerca lupi* observée au microscope photonique.
D'après Sréter et Széll. 2008

2) Mise en évidence d'antigènes circulants de *Dirofilaria immitis*

a) Principe des tests sérologiques

Les tests sérologiques indirects rapides disponibles en médecine vétérinaire pour le diagnostic de la dirofilariose cardio-pulmonaire reposent soit sur la méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), soit sur l'immunochromatographie. Ces tests sont faciles et rapides à mettre en œuvre et fournissent un résultat en une dizaine de minutes. Ils sont très satisfaisants en termes de sensibilité (94 à 100 %) et de spécificité (de l'ordre des 100%).

Quelle que soit la technique employée, l'objectif est de mettre en évidence des antigènes solubles circulants excrétés par les filaires adultes de *Dirofilaria immitis*, ces antigènes émanant principalement du tractus génital des vers femelles. La production de ces antigènes débute 5 à 7 mois après l'infestation du chien, durée qui correspond au délai de développement des larves en filaires adultes. Le seuil de détection est variable selon les tests : de 1 à 5 vers femelles adultes.

Les tests sérologiques sont capables de détecter les dirofilarioses occultes.

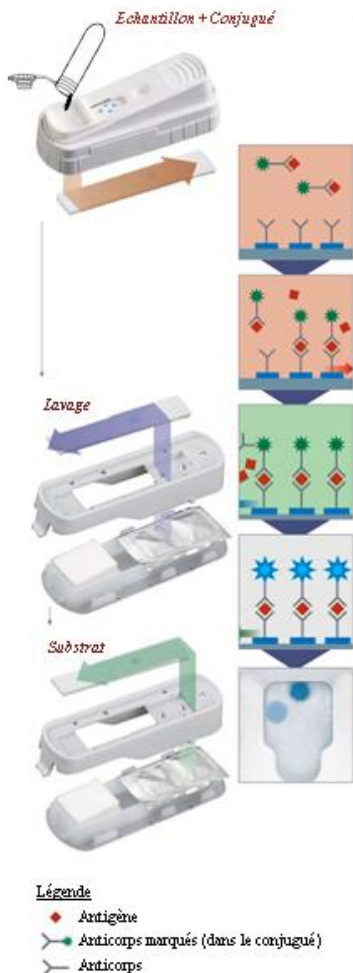
Notons que les tests sérologiques recherchant des anticorps ne sont plus utilisés du fait de leur manque de spécificité (Bourdoiseau. 2000).

- La méthode ELISA appliqué au Test Snap®

Ce test permet la détection qualitative ou semi-quantitative des antigènes de *Dirofilaria immitis* dans le sang, le sérum ou le plasma de chien. Le test Snap® repose sur une réaction immuno-enzymatique qui fait intervenir des anticorps spécifiques de l'antigène recherché, marqués avec une enzyme qui permet de transformer un substrat incolore en un produit coloré.

1. L'échantillon à analyser (sang, plasma ou sérum) est mélangé à une solution de conjugué contenant des anticorps couplés à une enzyme et dirigés spécifiquement contre les antigènes parasitaires recherchés : si l'échantillon testé contient ces antigènes, ils vont se fixer aux anticorps couplés à l'enzyme.

2. Le mélange est ensuite déposé dans le puits à échantillon du test Snap®. Il va migrer sur une membrane sur laquelle sont fixés des anticorps spécifiques de l'antigène cible. Cette migration à travers la fenêtre de lecture atteindra le cercle d'activation en 30 à 60 secondes.



3. Lorsque la couleur commence à apparaître dans le cercle d'activation, le dispositif Snap® est activé, libérant ainsi les réactifs stockés dans le test. Cela entraîne d'abord une seconde migration du mélange échantillon-conjugué sur la membrane, dans l'autre sens. Ce flux bidirectionnel permet d'optimiser la fixation du complexe antigène-anticorps aux anticorps fixés sur la membrane.

4. La solution de lavage parcourt ensuite la membrane pour éliminer les éléments non liés, qui pourraient interférer avec la lecture des résultats, en particulier dans les cas où le résultat est faiblement positif.

5. La solution de substrat incolore parcourt également la membrane et interagit avec les enzymes conjuguées. Chaque enzyme convertit des molécules de substrat initialement incolore en un produit coloré en bleu.

La coloration des pastilles révèle la présence d'antigènes.

Figure 45 : Principe du Snap Test®
(d'après IDEXX)

▪ La méthode immunochromatographique

La détection d'antigènes parasitaires par immunochromatographie sur membrane consiste à déposer l'échantillon à tester (sang total, sérum ou plasma) sur à l'extrémité d'une membrane de nitrocellulose.

Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec un anticorps marqué à l'or colloïdal. Les complexes antigènes-anticorps migrent par capillarité et sont arrêtés par des anticorps de capture fixés sur la membrane. Il se forme ainsi une première ligne colorée.

L'excès de complexe antigènes-anticorps continue de migrer et est immobilisé par un anticorps, entraînant l'apparition d'une seconde ligne colorée : cette ligne dite de contrôle valide le bon déroulement de la réaction.

Si la réaction est négative, seule la ligne de contrôle est colorée. Dans le cas d'une réaction positive, les deux lignes sont visibles.

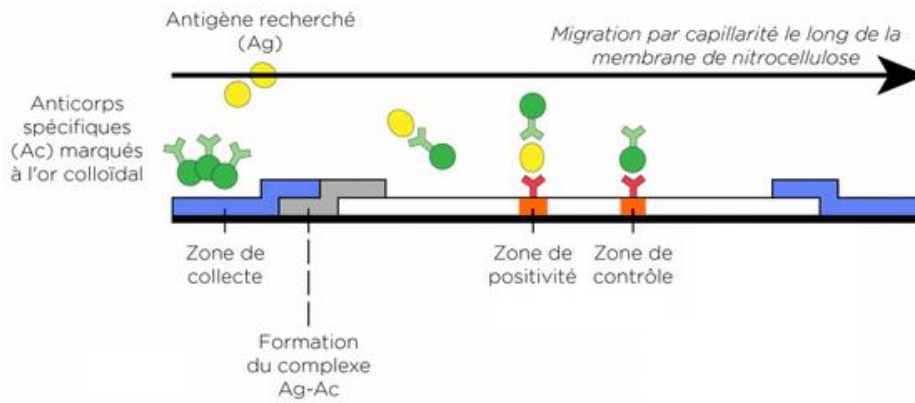


Figure 46 : Représentation schématique du principe d'un test d'immunochromatographie modifié d'après un schéma de sciencesetavenir.fr

b) Les différents tests sérologiques disponibles

Un certain nombre de kits commerciaux sont disponibles actuellement pour détecter les antigènes de *Dirofilaria immitis*.

- Les tests Snap® des laboratoires IDEXX utilisent la méthode ELISA.

Le Snap® Dirofilariose est le seul test permettant d'indiquer le niveau d'infestation grâce à l'évaluation semi-quantitative de la charge antigénique. L'apparition d'une coloration sur le ou les spots de charge antigénique faible ou élevée est proportionnelle à la concentration de l'antigène de *Dirofilaria immitis* dans l'échantillon, elle-même corrélée au nombre de parasites femelles adultes. Les résultats sont obtenus en 8 minutes. La sensibilité du Snap® Dirofilariose des laboratoires IDEXX dépend de la charge parasitaire : les échantillons provenant de chiens dont la charge parasitaire est très basse (moins de 2 vers femelles adultes) affichent une sensibilité de 91,7% ; les tests effectués sur des échantillons provenant de chiens dont la charge parasitaire est supérieure ou égale à 3 vers femelles ont une sensibilité de 99,2% (Atkins. 2003). Les données du fabricant indiquent une sensibilité de 98% et une spécificité de 100%.



Figure 47 : Lecture des résultats du Snap Test Dirofilariose® des laboratoires IDEXX

Notons que le laboratoire IDEXX commercialise le test Snap 4DX® qui permet à la fois la détection des antigènes de *Dirofilaria immitis* et des anticorps dirigés contre *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* et *Ehrlichia ewingi*.

- Les autres tests disponibles en France utilisent la méthode d'immunochromatographie. Parmi eux, on peut citer le test rapide KITVIA® avec une sensibilité de 94,4% et une spécificité de 100%, le Speed Diro® de VIRBAC avec une sensibilité de 95,2% et une spécificité de 99%, et le test Witness® de ZOETIS avec une sensibilité de 100% lorsque le nombre de vers femelles est supérieur à 2 et une spécificité de 98,3% (d'après les données des fabricants).
- Certaines publications tendent à montrer que les tests reposant sur la technologie ELISA sont plus sensibles que les tests immunochromatographiques (Courtney et al. 2001).

c) **Intérêts et limites des tests de détection des antigènes circulants**

i. **Avantages des tests de détection des antigènes circulants**

- Faciles d'exécution ; résultat immédiat.
- Spécificité proche de 100%.
- Sensibilité très satisfaisante (94 à 100 %).
- Capables de détecter les dirofilarioses occultes.
- Ils permettent le suivi de l'animal après la mise en place du traitement : une négativation de la recherche d'antigènes doit apparaître dans les 6 mois qui suivent le traitement adulticide si ce traitement est efficace.
- Méthode semi-quantitative pour le test Snap Dirofilariose® : il permet l'évaluation de la charge antigénique.

ii. **Limites des tests de détection des antigènes circulants**

- **Manque de sensibilité : faux négatifs**

Des réactions faussement négatives sur un animal infesté par *Dirofilaria immitis* se produisent quand le taux d'antigènes est inférieur au seuil de détection du test :

- Pendant la période pré-patente dans les 5 à 6 mois qui suivent une primo-infestation, les filaires étant immatures et ne libérant pas d'antigènes d'excrétion-sécrétion détectables par ces tests.
 - Lors de charge parasitaire faible (1 ou 2 filaires femelles adultes uniquement) ou lors d'infestation unisexe par des filaires mâles uniquement, les antigènes solubles émanant principalement du tractus génital femelle (McCall. 1992). Il a en effet été démontré qu'une faible charge parasitaire et un faible nombre de vers femelles diminuent la sensibilité des tests de détection antigénique (Atkins. 2003).
 - Des publications suggèrent également que chez certains chiens, les antigènes solubles des vers adultes peuvent être détruits par le système immunitaire ou être liés à des anticorps et formés des complexes immuns, ce qui peut conduire à des tests sérologiques faussement négatifs (Velasquez et al. 2014).
- **Manque de spécificité : faux positifs**

Une étude menée en 2012 a démontré qu'il pouvait exister des réactions croisées avec *Angiostrongylus vasorum* lors de l'utilisation de certains tests commerciaux de recherche d'antigènes de *Dirofilaria immitis* (Schnyder et al. 2012). Des réactions faussement positives ont été observées sur des chiens expérimentalement infestés par *Angiostrongylus vasorum* avec les tests PetChek®HTWM, DiroCHEK® et Snap HTWM RT® mais pas avec les tests Witness® et Snap 4DX®.

Ces réactions croisées s'expliqueraient par le fait que les antigènes de *Dirofilaria immitis* et d'*Angiostrongylus vasorum* partagent des épitopes communs (Schnyder et al. 2012).

3) Méthodes de diagnostic moléculaire

Les méthodes de PCR (Polymerase Chain Reaction) classique et de PCR quantitative pour détecter le matériel génétique des microfilaires sur des échantillons de sang de chiens ne sont pas disponibles en routine à l'heure actuelle.

Plusieurs études ont été menées depuis 2010 et des protocoles ont été mis en place pour détecter les microfilaires et déterminer à quelles espèces elles appartiennent à partir d'échantillons de sang sur EDTA (Gioia et al. 2010 ; Albonico et al. 2013). Certaines proposent également des protocoles qui permettent de mettre en évidence les larves chez les moustiques vecteurs (Latrofa et al. 2012 ; Katja et al. 2014).

La publication de Latrofa et al. en 2012 propose un protocole de PCR duplex pour détecter et différencier les microfilaires sanguines de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens*. C'est sur cette étude que va s'appuyer la partie expérimentale de cette thèse.

Les régions ciblées par les amorces de la qPCR sont un fragment d'environ 200 paires de bases de la sous unité 1 du gène du cytochrome C oxidase mitochondrial (cox-1) pour *Dirofilaria immitis* et un fragment d'environ 300 paires de bases de l'espace interne transcrit 2 (ITS-2) de l'ADN ribosomal pour *Dirofilaria repens*.

La méthode est reconnue comme étant hautement sensible pour la détection simultanée des microfilaires et la différenciation entre ces deux espèces (Latrofa et al. 2012).

4) Recommandations actuelles pour optimiser le diagnostic

Les tests sérologiques de détection de l'antigène constituent actuellement la méthode de diagnostic la plus sensible (Vezzani et al. 2008).

Il est néanmoins toujours recommandé d'effectuer un test de concentration sanguine pour rechercher les microfilaires en parallèle de ce test sérologique (American Heartworm Society, 2014). Ceci est particulièrement important s'il existe un fort degré de suspicion ou si l'historique des traitements préventifs de la dirofilariose n'est pas connu.

III. Traitement et prévention de la dirofilariose canine

1) Traitement de la dirofilariose canine à *Dirofilaria immitis*

L'objectif du traitement est d'améliorer l'état clinique de l'animal et d'éliminer tous les stades du parasite *Dirofilaria immitis* (microfilaires, larves en migration, juvéniles et filaires adultes) en limitant au maximum les complications secondaires au traitement.

L'élimination des parasites n'est pas sans risque en particulier quand l'infestation est importante du fait des effets secondaires liés à la destruction massive de vers dans la circulation sanguine. Il est nécessaire de choisir une stratégie thérapeutique appropriée et il est parfois préférable de ne pas recourir à un traitement spécifique de la maladie.

a) Traitement médical

i. Evaluation préalable au traitement

Une fois le diagnostic de dirofilariose cardio-pulmonaire établi, il est primordial d'évaluer le stade clinique de l'animal en s'appuyant sur la classification par gravité des symptômes (classes I, II, III ou IV). Il est également recommandé de réaliser un bilan biochimique pour évaluer les fonctions hépatiques et rénales et un bilan hématologique. Les techniques d'imagerie telles que la radiographie thoracique et l'échocardiographie sont utiles pour évaluer les conséquences cardio-vasculaires de l'infestation.

Ainsi, avant d'envisager un traitement adulticide, il faut se poser la question de la balance bénéfice-risque du traitement en fonction des éléments cliniques, radiographiques et échographiques dont on dispose et il faut tenir compte de la capacité du propriétaire à limiter l'activité physique du chien après le traitement.

Sur des chiens présentant un Syndrome de la Veine Cave, le traitement médical de première intention est déconseillé, le risque de thromboembolie pulmonaire mortelle étant considérable. Il est recommandé de procéder préalablement à l'extraction chirurgicale (fibroscopie par voie jugulaire) des vers adultes.

ii. Traitement adulticide

Le seul traitement adulticide disposant d'une AMM pour la dirofilariose canine est la **mélarsomine** dont le nom déposé est **IMMITICIDE®** des laboratoires Merial. Cette molécule est efficace sur les vers âgés de plus de 4 mois et n'a pas d'action sur les formes larvaires L3 et L4.



Figure 48 : IMMITICIDE® des laboratoires Merial, le seul traitement adulticide avec une AMM

Le protocole standard indiqué dans l'AMM consiste en l'administration de deux doses de 2,5mg/kg de mélarsomine à 24 heures d'intervalle, par injection intramusculaire profonde en région lombaire, entre L3 et L5. Ce protocole est utilisé pour traiter des animaux avec une dirofilariose subclinique à modérée (classe I et classe II). Il permet d'éliminer 90% des vers adultes (American Heartworm Society 2014). L'animal doit être au repos complet (en cage avec des sorties en laisse) pendant les 4 semaines qui suivent le traitement pour limiter les risques de thromboembolie pulmonaire (Dillon et al. 1995).

Chez les chiens qui présentent une forme clinique plus grave (classe III) avec une atteinte marquée de l'état général et qui sont donc susceptibles de développer une thromboembolie pulmonaire, ce traitement doit être plus progressif : après une première injection intramusculaire initiale à la dose de 2,5mg/kg de mélarsomine, le protocole standard (avec deux injections à 2,5mg/kg en IM à 24 heures d'intervalle) est mis en œuvre 1 mois après la première injection. Cela permet ainsi d'éliminer 98% des vers adultes. L'animal doit être au repos strict pendant les 8 semaines qui suivent la première injection.

Aux États-Unis, l'American Heartworm Society recommande désormais ce protocole de traitement progressif en 3 injections pour tous les animaux, quelle que soit l'intensité des signes cliniques du fait de sa plus grande efficacité et de sa plus grande sécurité en termes de complications post-traitement.

L'utilisation de la mélarsomine reste en revanche contre-indiquée en cas de Syndrome de la Veine Cave ou de thromboembolie pulmonaire.

Historiquement, d'autres molécules filaricides ont été utilisées : c'est le cas notamment du thiacétarsamide qui était efficace sur les formes adultes mais qui présentait une hépatotoxicité et une néphrotoxicité importante, d'où l'arrêt de son utilisation.

- **Effets indésirables liés au traitement adulticide**

- Effets locaux directement imputables à la mélarsomine

Les effets indésirables locaux les plus fréquemment rapportés sont une douleur au point d'injection accompagnée d'un œdème, pouvant entraîner une gêne locomotrice passagère.

Des troubles neurologiques ont également été décrits suite à l'administration de mélarsonine aux Etats-Unis : trois cas ont été décrits par Hettlich et al. en 2003 et un cas par Moore et al. en 2013 avec des chiens qui ont présenté une paraparésie d'apparition brutale avec un déficit proprioceptif des membres pelviens quelques heures après l'injection. Le mécanisme physiopathologique n'a pas été clairement établi mais l'hypothèse des auteurs est que les troubles s'expliqueraient par une compression médullaire faisant suite à la réaction inflammatoire locale au niveau du site d'injection (sauf pour un des chiens où une injection intra-durale est fortement suspectée).

- Effets liés à la mort des vers adultes

Les deux principales complications liées à la mort des filaires adultes sont la thromboembolie pulmonaire et le choc anaphylactique.

La thromboembolie pulmonaire est une conséquence du traitement adulticide et peut être grave voire mortelle. Les signes cliniques apparaissent généralement dans les 7 à 10 jours qui suivent le traitement filaricide mais des cas sont rapportés jusqu'à 30 jours post-traitement. Elle se traduit par une baisse de l'état général, de la dyspnée, parfois de la toux et de l'hémoptysie.

Les conséquences sont généralement minimales chez les animaux peu débilisés et porteurs d'un petit nombre de vers adultes : une embolie légère dans des zones relativement saines des poumons peut passer cliniquement inaperçue (Hirano et al. 1992).

Certains patients sont plus à risque de développer des complications thromboemboliques suite au traitement : c'est le cas des chiens avec des signes cliniques sévères liés à la maladie, avec une activité physique importante, avec des images radiographiques thoraciques ou échocardiographiques anormales et avec une concentration élevée d'antigènes circulants. Le

facteur crucial pour réduire le risque de complications thromboemboliques est une limitation stricte des efforts physiques suite au traitement.

Le choc anaphylactique (Hypersensibilité de type I) est dû à la libération massive d'antigènes suite à la destruction des parasites. Les manifestations cliniques sont observées dans la semaine qui suit l'injection avec des symptômes de fièvre, d'anorexie et de dépression. Un traitement corticoïde est alors mis en place.

- Probabilité de survenue des effets indésirables en fonction de la classe de la maladie

Une étude rétrospective a été menée de 2008 à 2011 sur 50 chiens souffrant de dirofilariose cardio-pulmonaire pris en charge à l'Université de Louisiane selon les recommandations de l'American Heartworm Society (protocole décrit dans la Partie c). Il en a résulté que les effets indésirables faisant suite au traitement sont fréquents mais la plupart sont mineurs (réaction locale au site d'injection de la mélarsonine, troubles gastro-intestinaux, troubles comportementaux possiblement secondairement à la douleur). Aucun des chiens avec une dirofilariose de classe I (asymptomatique ou symptômes mineurs) n'a présenté d'effets secondaires majeurs. Sept chiens (14%) sont morts dans la période qui suit le traitement, du fait d'une thromboembolie pulmonaire ou de la progression de la maladie cardiaque. Parmi eux, 4 avaient initialement présenté un Syndrome de la Veine cave (classe IV), 2 étaient en classe III, et un seul en classe II.

iii. Traitement microfilaricide

Les principes actifs utilisés pour détruire les microfilaires sanguines appartiennent à la famille des lactones macrocycliques et sont les mêmes que ceux utilisés en chimioprévention de la maladie (destruction des larves L3 et L4 dans le mois suivant l'infestation). Il s'agit de l'ivermectine, la milbémécine oxime, la sélamectine et la moxidectine (Tableau 11).

L'effet des lactones macrocycliques sur les microfilaires sanguines reste mal connu : elles agiraient sur le système nerveux des larves, altérant leur viabilité, et bloqueraient le développement des stades pré-larvaires dans l'utérus des vers femelles (Bowman et Mannella, 2011).

Seule la moxidectine à application topique (ADVOCATE[®]) a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) aux USA comme traitement pour l'élimination des microfilaires. Les autres spécialités disponibles sont utilisables en ce but mais cette indication ne figure pas dans leur AMM.

Des études ont montré que l'administration mensuelle d'ivermectine ou de milbémécine oxime permettait de supprimer la microfilarémie sur certains chiens infestés en l'absence de traitement adulticide (Bowman et al. 1992 ; McCall et al. 1998). De plus, il a été montré pour la milbémécine oxime qu'avec un traitement mensuel pendant 6 mois, la microfilarémie était toujours très basse voire nulle dans les 6 mois après l'arrêt du traitement (Bowman et al. 1992). C'est cette molécule qui est considérée comme la plus efficace contre les microfilaires (Villeneuve, 2014).

La suppression de la microfilarémie a des conséquences en terme de diagnostic : sur des chiens ayant reçu des lactones macrocycliques, il faut privilégier la détection de l'antigénémie pour rechercher une dirofilariose cardio-pulmonaire.

Néanmoins, il faut tenir compte du fait que 10% à 20% des chiens infestés microfilarémiques qui sont traités mensuellement avec des lactones macrocycliques sans traitement adulticide vont continuer à présenter une microfilarémie même après 12 mois de traitement (Bowman et al. 2011). Ce sont ces animaux qui sont à risque de transmettre des microfilaires résistantes aux lactones macrocycliques.

En l'absence de traitement microfilaricide, il est possible qu'un chien sur lequel l'antigénémie n'est plus détectable après un traitement adulticide possède toujours des microfilaires

sanguines jusqu'à 2,5 ans après la mort des vers adultes (Underwood et Harwood. 1939). Cela s'explique par leur longue durée de vie dans le sang circulant.

- **Effets indésirables liés au traitement microfilaricide**

Les lactones macrocycliques peuvent entraîner une diminution rapide du nombre de microfilaires dans le sang circulant et doivent être utilisées avec précaution sur les chiens microfilarémiques. Il est mentionné dans les résumés des caractéristiques des produits (RCP) des spécialités vétérinaires disponibles que des effets indésirables peuvent survenir : « *Le traitement de chiens porteurs de microfilaires circulantes peut conduire à l'observation de réactions d'hypersensibilité telles que : muqueuses pâles, vomissements, tremblements, essoufflements ou salivation excessive. Ces réactions sont dues à la libération de protéines lors de la mort des microfilaires et non à un effet toxique du produit. Le traitement des chiens porteurs de microfilaires circulantes n'est donc pas recommandé* » (d'après le RCP de MILBEMAX[®] Chien).

Ces effets indésirables restent néanmoins peu fréquents et de gravité modérée si bien que l'utilisation de lactones macrocycliques comme traitement microfilaricide est considérée comme sûre par la Food and Drug Administration (FDA) dans la mesure où une surveillance de l'animal par le vétérinaire est mise en place dans les 12 heures qui suivent l'administration (Bowman et Manella. 2011). De plus, aucun effet indésirable n'a été observé dans les études de laboratoire et de terrain menées pour l'approbation de la moxidectine à application topique (ADVOCATE[®]) comme traitement microfilaricide (McCall et al. 2014).

iv. Traitements adjuvants

• La doxycycline

Les bactéries intracellulaires du genre *Wolbachia* sont symbiotiques de *Dirofilaria immitis*. L'antibactérien de choix pour les détruire est la doxycycline qui permet de réduire considérablement le nombre de *Wolbachia* chez les parasites et ce, à tous les stades évolutifs (larves, juvéniles, adultes, microfilaries). La posologie recommandée par l'American Heartworm Society est de 10 mg/kg deux fois par jour pendant quatre semaines : une publication de McCall et al. en 2011 a montré l'efficacité de la doxycycline à cette dose contre les stades larvaires en migration, les formes juvéniles et contre la production de microfilaries sanguines.

La mort des *Wolbachia* est délétère pour les vers adultes mais ces derniers ne sont pas suffisamment dépendants de leur hôte symbiotique pour qu'un traitement antibiotique seul permette de les éliminer (Bowman et Manella. 2011). Les vers femelles deviennent stériles en l'absence des *Wolbachia*, du fait d'un blocage de l'embryogenèse précoce. L'administration de doxycycline peut ainsi permettre une diminution graduelle de la microfilarémie sans pour autant la rendre nulle. Il a en revanche été démontré que l'association ivermectine (6 µg/kg per os 1 fois par semaine) et doxycycline (10 mg/kg/j les semaines 1–6, 10–11, 16–17, 22–25, 28–33) permettait d'éliminer les microfilaries sanguines en 9 à 12 semaines et présentait des propriétés adulticides (Bazzocchi et al. 2008 ; McCall et al. 2008).

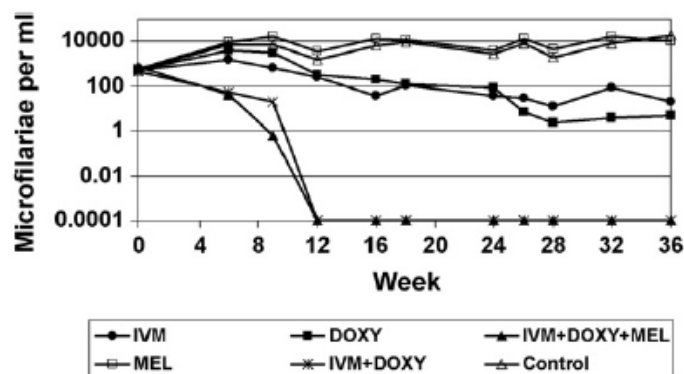


Figure 49 : Evolution de la microfilarémie chez des chiens recevant de l'ivermectine seule (IVM) 1 fois par semaine, de la doxycycline seule (DOXY) par intermittence, les deux (IVM+DOXY), avec ou sans mélarsonine (MEL) à la semaine 26 (protocole en 3 injections). Ces chiens s'étaient préalablement vu transplantés des filaires adultes 6 semaines avant le début du protocole. D'après McCall et al. 2008.

Les microfilaries déjà présentes au moment du traitement antibiotique avec la doxycycline se verront privées de leur hôte symbiotique *Wolbachia* : de ce fait, celles qui infesteront des moustiques à l'occasion d'un repas de sang se développeront en larves L3 qui seront

incapables d'infester un nouvel hôte (McCall et al. 2008). Le traitement antibiotique présente donc également un intérêt pour éviter la transmission de la maladie.

De plus, l'administration de doxycycline durant les deux premiers mois qui suivent l'infestation est létale pour les larves L3 et L4 et empêche leur développement (McCall et al. 2011). L'élimination des *Wolbachia* conduit ainsi à une inhibition de la croissance des stades larvaires.

Les protéines de surface de *Wolbachia* (WSP), qui se trouvent exposées au système immunitaire après la mort des parasites, sont impliquées dans la réaction inflammatoire rénale et pulmonaire, la bactérie contribuant à la pathogénie de la maladie (Kramer et al. 2005).

Il est ainsi conseillé d'administrer un antibiotique actif contre ces bactéries tel que la doxycycline avant de commencer la thérapie adulticide afin que les *Wolbachia* et leurs métabolites soient moins nombreux voire même absents au moment où les filaires meurent. Des études récentes ont montré que cela permettrait d'améliorer l'espérance de vie et de réduire la pathologie pulmonaire et rénale (Morchon et al. 2011).

▪ **Les glucocorticoïdes**

L'administration de prednisolone à dose anti-inflammatoire en parallèle du traitement spécifique adulticide aide à contrôler les signes cliniques de la thromboembolie pulmonaire (Atwell and Tarish. 1995). L'efficacité de la mélsarsomine n'est pas diminuée lors d'utilisation conjointe de glucocorticoïdes, contrairement à ce qui avait pu être prouvé dans le passé pour le thiacétarsamide (Dzimianski et al. 2010). La prednisolone est administrée par voie orale pendant 1 mois à dose dégressive : la posologie recommandée est de à 0,5 mg/kg BID la première semaine, 0,5 mg/kg SID la deuxième semaine puis 0,5 mg/kg tous les deux jours pendant 1 à 2 semaines (d'après les recommandations de l'American Heartworm Society 2014).

v. **Traitement de la thromboembolie pulmonaire**

D'après l'article de Lunsford et Mackin publié en 2007, le traitement de la thromboembolie pulmonaire chez le chien fait intervenir une anti-vitamine K, la warfarine (à 0,22mg/kg/12h initialement puis ajusté selon le temps de prothrombine) associée à de l'héparine non fractionnée (200 à 500UI/8h en SC) pendant les 5 à 7 premiers jours de traitement. Une alternative proposée est l'utilisation d'héparine de bas poids moléculaire telle que l'énoxaparine (à 0,8mg/kg/6h en SC) ou la daltéparine (à 150U/kg/12h en SC).

Contrairement à ce qui a pu être fait dans le passé de manière empirique, l'utilisation de l'aspirine pour ses effets anti-thrombotiques n'est pas recommandée par l'American Heartworm Society dans le cadre du traitement de la dirofilariose (Tarish et al. 1993 ; Boudreaux et al. 1991).

b) Traitement chirurgical

i. Syndrome de la Veine Cave

Le traitement médical adulticide est déconseillé dans les cas d'infestations sévères, en particulier lors de Syndrome de la Veine Cave. Les risques d'embolie mortelle et de choc antigénique lié à la mort rapide des vers sont dans ces cas considérables.

Il est alors préférable de procéder à l'extraction chirurgicale des filaires adultes situées dans les cavités du cœur droit, la veine cave et les artères pulmonaires préalablement au traitement médical spécifique de la maladie. Ce traitement chirurgical ne s'envisage néanmoins qu'après une stabilisation médicale de l'état clinique de l'animal. Certaines publications suggèrent de traiter préalablement l'animal avec de la prednisolone (0,5 mg/kg, BID, PO), de la doxycycline (5 mg/kg, BID, PO) et du clopidogrel (2 à 4 mg/kg, SID, PO) pendant la semaine qui précède l'intervention et de poursuivre ce traitement jusqu'à une semaine post-opératoire (Won-Kyoung et al. 2011). Cela a pour but de diminuer les risques de thromboembolie, de complications liées à la libération des *Wolbachia* et au relargage massif d'antigènes par les filaires lors de la chirurgie.

L'approche chirurgicale consiste en la réalisation d'une veinotomie de la veine jugulaire en vue d'y introduire des pinces préhensiles telles que la pince alligator, la pince basket ou la pince forceps tripode pour retirer un maximum de vers.

L'extraction des vers peut se faire à l'aveugle ou sous contrôle échocardiographique ou fluoroscopique.

Le risque majeur lié à cette intervention est l'arrêt cardiaque suite à l'introduction du matériel chirurgical dans les cavités cardiaques. Ce risque est majoré sur les chiens de petit format.

Quelques semaines après cette chirurgie ayant pour but d'éliminer mécaniquement la majeure partie des vers adultes, le traitement médical adulticide pourra être mis en place pour éliminer les vers restants.



Figure 50 : Méthode d'extraction des filaires avec l'introduction d'un cathéter introducteur.
 (A) Introduction du cathéter introducteur dans la veine de jugulaire externe gauche guidée par le fil de guide pré placé dans l'atrium droit, le ventricule droit et l'artère pulmonaire.
 (B) et (C) Introduction de la pince préhensile pour retirer les vers sous contrôle fluoroscopique.
 D'après Won-Kyoung Yoon et al. 2011

ii. Localisation oculaire

Lors de localisation erratique oculaire des vers, le traitement médical filaricide est déconseillé car la mort de la filaire peut entraîner une inflammation sévère du globe oculaire.

Lorsque le parasite est situé dans la chambre antérieure de l'œil, son extraction mécanique sous anesthésie générale par des techniques de microchirurgie est envisageable.

En revanche, cela est impossible pour les vers localisés dans le corps vitré. Le seul traitement qu'il est possible de mettre en place est un traitement local symptomatique à base de collyres anti-inflammatoires.

c) Recommandations actuelles en termes de traitement

L'American Heartworm Society recommande une approche multimodale faisant intervenir les lactones macrocycliques, la doxycycline, la prednisolone et la mélarsonine.

La première mesure thérapeutique à mettre en place suite au diagnostic de dirofilariose à *Dirofilaria immitis* est l'administration concomitante de :

- Lactones macrocycliques : 3 fois à un mois d'intervalle. Il convient de surveiller l'état clinique de l'animal dans les 8 à 12 heures qui suivent la première administration.
- Doxycycline à la dose de 10 mg/kg 2 fois par jour par voie orale pendant 4 semaines.

L'association de la doxycycline et de lactones macrocycliques telle que l'ivermectine présente un double intérêt : elle potentialise l'action microfilaricide des deux molécules et a un effet adulticide (Grandi et al. 2010). Ainsi, y recourir avant le traitement filaricide à base de mélarsonine améliore l'état clinique des animaux atteints et réduit les risques de choc antigénique et de thromboembolie pulmonaire (Kramer et al. 2008).

Sur les chiens à la symptomatologie marquée et avec une microfilarémie importante (> 5000 microfilaires/ml), il est envisageable d'administrer des anti-histaminiques ou de la prednisolone à dose dégressive pendant le mois qui suit la première administration de lactones macrocycliques.

Au 2^{ème} mois, un traitement adulticide peut être mis en place avec l'injection intramusculaire de mélarsomine à la dose de 2,5 mg/kg, suivi au 3^{ème} mois par le traitement adulticide standard avec deux injections à 2,5 mg/kg en IM à 24 heures d'intervalle. Dans le mois qui suit chaque injection de mélarsonine, il est recommandé d'administrer des glucocorticoïdes à doses anti-inflammatoires dégressives et de restreindre drastiquement l'exercice du chien.

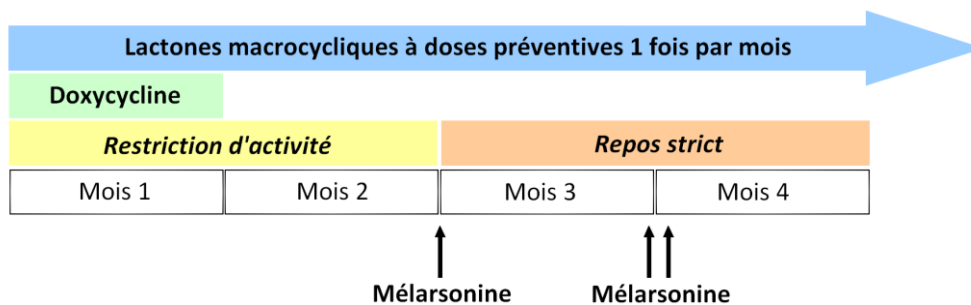


Figure 51 : Schéma récapitulatif du protocole de traitement actuellement recommandé par l'American Heartworm Society.

Six mois après les deux injections de mélarsonine (soit 9 mois post-diagnostic), il est fortement conseillé de contrôler l'efficacité du traitement adulticide à l'aide d'un test rapide détectant les antigènes des vers adultes : si toutes les filaires femelles adultes ont été

éliminées, l'antigénémie doit être indétectable. Si ce n'est pas le cas, il est possible de répéter le protocole de traitement.

Les étapes du protocole sont détaillées dans le Tableau 10 ci-dessous :

Tableau 10 : Recommandations actuelles en termes de protocole de traitement de la dirofilariose canine à *Dirofilaria immitis*, d'après l'American Heartworm Society

Date	Traitement et Tests diagnostics
J0	Établissement du diagnostic de dirofilariose Traitement larvicide/microfilaricide = Lactone macrocyclique à doses chimio prophylactiques
J0 à J28	Doxycycline à 10 mg/kg BID par voie orale pendant 4 semaines +/- Prednisolone par voie orale à 0,5 mg/kg BID la 1 ^{ère} semaine, à 0,5 mg/kg SID la 2 ^{ème} semaine, puis à 0,5 mg/kg aux 2 jours les 3 ^{ème} et 4 ^{ème} semaines REPOS MODÉRÉ
J30	Traitement larvicide/microfilaricide = Lactone macrocyclique
J60 à 2 mois	Traitement larvicide/microfilaricide = Lactone macrocyclique Traitement adulticide = Mélarsonine à 2,5 mg/kg IM
J60 à J90	Prednisolone par voie orale à 0,5 mg/kg BID la 1 ^{ère} semaine, à 0,5 mg/kg SID la 2 ^{ème} semaine, puis à 0,5 mg/kg aux 2 jours les 3 ^{ème} et 4 ^{ème} semaines REPOS STRICT
J90 à 3 mois	Traitement larvicide/microfilaricide = Lactone macrocyclique Traitement adulticide = Mélarsonine à 2,5 mg/kg IM
J91	Traitement adulticide = Mélarsonine à 2,5 mg/kg IM
J91 à J120	Prednisolone par voie orale à 0,5 mg/kg BID la 1 ^{ère} semaine, à 0,5 mg/kg SID la 2 ^{ème} semaine, puis à 0,5 mg/kg aux 2 jours les 3 ^{ème} et 4 ^{ème} semaines REPOS STRICT
J120 à 4 mois	Recherche de microfilaries circulantes Larvicide/microfilaricide = Lactone macrocyclique si des microfilaries sont détectées
9 mois	Détection d'antigènes des vers femelles adultes

D'autres protocoles de traitement dits de « mort lente des parasites » ont été proposés : ils consistent en l'administration de doxycycline pendant 1 mois et en l'administration mensuelle de lactones macrocycliques pendant 1 à 2 ans avec des contrôles de la microfilarémie et de l'antigénémie tous les 6 mois à 1 an. Il a en effet été démontré qu'une administration mensuelle de longue durée d'ivermectine permettait d'éliminer les larves, les immatures et les adultes et que la plupart des chiens devienaient amicrofilarémiques après 6 à 9 mois de traitement (McCall et al. 2008). Néanmoins, 10% à 20% des chiens infestés microfilarémiques qui sont traités mensuellement avec des lactones macrocycliques sans traitement adulticide vont continuer à présenter une microfilarémie même après 12 mois de traitement (Bowman et al. 2011). Ces animaux risquent alors de transmettre des microfilaries résistantes aux lactones macrocycliques : ce type de traitement est donc désormais déconseillé (Villeneuve. 2014).

2) Prophylaxie de la dirofilariose canine

a) Mesures sanitaires et chimiques pour éviter l'infestation

Les mesures sanitaires ont pour but de limiter l'exposition du chien aux moustiques pour éviter une éventuelle transmission de la parasitose. Ainsi, il est conseillé d'éviter de voyager avec son chien en zone d'endémie (dans les DOM-TOM en particulier).

Pour les animaux résidant dans des zones à risque comme les DOM-TOM mais aussi dans une moindre mesure la Corse et le pourtour méditerranéen, il est recommandé de confiner les chiens à l'intérieur au moment où les moustiques sont le plus actifs, c'est-à-dire en fin de journée.

Des produits insecticides disposant d'une AMM vétérinaire sont disponibles pour lutter contre les piqûres des moustiques vecteurs en zone d'endémie :

- Le collier SCALIBOR® (Deltaméthrine) dispose d'une AMM avec l'indication « Prévention des piqûres de moustiques (*Culex pipiens*) pendant 6 mois ».
- Le Spot-On ADVANTIX® (Permethrine + Imidaclopride) protège contre les moustiques pendant 2 semaines (pour *Aedes aegypti*) à 4 semaines (pour *Culex pipiens*).
- Le Spot-On VECTRA 3D® (Permethrine + Pyriproxyfène + Dinotéfurane) prévient les piqûres de phlébotomes (*Phlebotomus perniciosus*), de moustiques (*Culex pipiens*, *Aedes aegypti*) et de mouches d'étable (*Stomoxys calcitrans*) pendant un mois après l'application.

Aucune spécialité par voie orale n'est disponible. Pour les pipettes spot-on, l'efficacité est conditionnée par les bonnes conditions d'application du produit : il faut s'assurer que le propriétaire les applique correctement sur la peau en écartant le poil, conformément à la notice d'utilisation et qu'il ne baigne pas son chien dans les deux jours qui précèdent et qui suivent l'application.



Figure 52 : Trois exemples de spécialités vétérinaires disponibles pour prévenir les piqûres de moustiques, vecteurs de la dirofilariose cardio-pulmonaire

b) Mesures médicales de chimioprévention

La chimioprévention a pour objectif de détruire les larves transmises par les moustiques afin d'empêcher qu'elles ne se développent en adultes. Elle permet ainsi de prévenir l'apparition de la maladie causée par les filaires adultes.

Les traitements préventifs de la dirofilariose font intervenir des molécules de la famille des lactones macrocycliques (ivermectine, milbémycine oxime, moxidectine et sélamectine) et permettent la destruction des larves L3 et L4 dans les 30 jours qui suivent l'infestation. Pour rappel, la mélarsonine agit uniquement sur les vers âgés de plus de 4 mois et n'a pas d'action sur les formes larvaires L3 et L4. Ainsi, pour les stades L4 avancés et les juvéniles de *Dirofilaria immitis*, il existe un manque de sensibilité des parasites aux lactones macrocycliques. Des études ont néanmoins montré que sur des chiens recevant de l'ivermectine mensuellement pendant 1 an, l'efficacité du traitement larvicide était de 97,7% contre les larves de 3 mois et de 95,1% contre les larves de 4 mois (McCall et al. 1995). De plus, les vers adultes issus de ces larves ayant été soumises à l'ivermectine pendant leur croissance sont plus petits, moins mobiles et présentent un épaissement de leur paroi digestive (Steffens and McCall, 1998).



Figure 53 : Sensibilité des différents stades évolutifs de *Dirofilaria immitis* aux lactones macrocycliques et à la mélarsonine, d'après Wolstenholme et al. 2015

La chimioprévention est recommandée pour les chiens vivants en zone endémique pendant la saison à risque (de Mai à Octobre en Europe) ou encore pour des animaux qui voyagent en zone d'endémie. L'American Heartworm Society encourage même une administration préventive continue sur toute l'année dans certaines régions des États-Unis.

Il est important de tester les chiens avant de débiter le traitement préventif (recherche d'antigènes et de microfilaries sanguines) pour identifier les animaux infestés par des filaires adultes. Cela permet de détecter les infestations subcliniques et évite la remise en cause de l'efficacité du traitement chimiopréventif si une infestation préexistante se révèle par la suite. D'autre part, bien que le traitement larvicide préventif soit relativement sécuritaire, des effets

secondaires ont été rapportés en présence de microfilaries sanguines, d'où l'importance de connaître le statut de l'animal pour le surveiller suite à l'administration en cas d'infestation.

La milbémycine oxime et l'ivermectine s'administrent par voie orale une fois par mois. La moxidectine et la sélamectine se présentent sous forme de spot-on et s'appliquent une fois par mois. Il existe également une formulation à libération prolongée de moxidectine (GUARDIAN SR®) par injection sous-cutanée qui se renouvelle tous les 6 mois. L'efficacité et la fiabilité de ces molécules a été validée par plusieurs études (Moraes-da-Silva et al. 2016 ; Blagburn et al. 2016).

Plusieurs médicaments disposent d'une AMM pour la prévention de la dirofilariose canine. Ils sont présentés dans le Tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 : Les spécialités vétérinaires disponibles disposant d'une AMM pour la prévention de la dirofilariose canine

Molécule	Nom déposé	Voie d'administration	Posologie	Fréquence de traitement
Ivermectine	HEARTGARD® (USA)	Voie orale	6 µg/kg	Mensuel
Milbémycine oxime	MILBEMAX® INTERCEPTOR® TRIFEXIS®	Voie orale	0,5 mg/kg	Mensuel
Sélamectine	STRONGHOLD®	Spot on systémique	6 mg/kg	Mensuel
Moxidectine	ADVOCATE®	Spot on systémique	2,5 mg/kg	Mensuel
Moxidectine	GUARDIAN SR®	Injection sous-cutanée	0,17 mg/kg	6 mois

Certains chiens de races Colley et apparentés (Shetland, Collie barbu, Bobtail, Berger australien, Berger blanc suisse, Border Collie) présentent une sensibilité médicamenteuse à certaines molécules de la famille des lactones macrocycliques. Cette sensibilité est due à une mutation du gène MDR1 codant pour une protéine de transport, la glycoprotéine P. Celle-ci s'oppose normalement à la pénétration de nombreux médicaments dans le cerveau en agissant comme pompe de reflux bloquant ou limitant fortement leur passage dans le système nerveux central. Les chiens présentant une glycoprotéine P déficiente sont susceptibles de présenter des symptômes neurologiques suite à la prise de ces médicaments. Il a été démontré que le traitement chimioprophylactique avec des lactones macrocycliques à la posologie adaptée pour la prévention de la dirofilariose cardiaque est sans danger chez toutes les races concernées par cette mutation (Jeyer et Janko. 2012). Néanmoins, leur utilisation à des doses plus élevées chez des chiens MDR1 mutés (-/-) peut être à l'origine de troubles neurologiques.

Historiquement, une autre molécule était utilisée pour ses propriétés larvicides : le diéthylcarbazine citrate (DEC), un dérivé de la pipérazine. Son administration était quotidienne pour la prévention de l'infestation par *Dirofilaria immitis*. Néanmoins, des effets indésirables graves ont été rapportés sur des chiens avec des microfilaries sanguines allant du choc anaphylactique au décès de l'animal. Il était donc primordial de s'assurer que l'animal était afilterémique avant d'instaurer ce traitement préventif (Bowman et Mannella. 2011).

c) **La résistance aux lactones macrocycliques**

La résistance des parasites à un traitement anthelminthique se définit comme leur capacité à survivre à ce traitement alors qu'elles y sont normalement sensibles. Cette tolérance au traitement est susceptible d'être transmise à leur descendance et il en résulte l'apparition de populations résistantes.

Des cas d'échecs du traitement préventif de la dirofilariose sont rapportés aux États-Unis, le plus souvent dans la région du delta du Mississippi où la prévalence de la maladie est importante. Ils se traduisent par l'infestation d'un chien traité mensuellement avec des lactones macrocycliques. Notons que la Food and Drug Administration rapporte en 2005 que 78% des signalements de manque d'efficacité sont attribués à un manque d'observance du protocole de prévention (dose inappropriée, date du traitement non respectée...).

Dépister les chiens avant d'envisager un traitement préventif est un point clé dans la lutte contre les résistances. L'utilisation des tests de concentration des microfilaries pour tester les animaux, en complément aux tests sérologiques est recommandée (Villeneuve. 2014). En effet, le traitement avec des lactones macrocycliques seules lors d'infestations asymptomatiques avec une faible charge parasitaire serait le principal mécanisme de sélection de résistance (McCall. 2005).

Cela s'explique par le fait que ce traitement ne détruira qu'une partie des microfilaries présentes dans le sang. Chez 10% à 20% des chiens infestés microfilarémiques qui sont traités mensuellement avec des lactones macrocycliques sans traitement adulticide, la microfilarémie sera encore détectable même après 12 mois de traitement (Bowman et al. 2011). Ce sont ces animaux qui sont à risque de transmettre des microfilaries résistantes aux lactones macrocycliques à un moustique vecteur puis à un autre chien. Ces vers, une fois adultes, seront alors susceptibles de produire une descendance capable de survivre à ces molécules.

Un autre facteur qui favorise l'apparition de résistance est l'utilisation exclusive et à grande échelle de médicaments présentant le même mode d'action, ce qui est le cas avec les lactones macrocycliques.

D'après une étude de Bourguinat et al. menée en 2011, il existe une hétérogénéité génétique chez le parasite pour le gène codant pour les glycoprotéines P de transport des substances impliquées dans le métabolisme de l'ivermectine et il pourrait servir de support à la résistance aux lactones macrocycliques.

3) Traitement et prévention des autres filarioses canines

a) *Dirofilaria repens*

i. Traitement de la dirofilariose sous-cutanée à *Dirofilaria repens*

L'infestation par *Dirofilaria repens* est le plus souvent asymptomatique chez le chien. Néanmoins, du fait du caractère zoonotique de la parasitose, la détection de microfilaires sanguines chez le chien doit motiver la mise en place d'un traitement même si aucun symptôme n'est observé. Cette élimination des parasites a pour but d'éviter que l'animal ne serve de réservoir. Il s'agit ainsi du seul moyen de prévenir d'éventuelles infestations humaines (Pétry et al. 2015).

Une étude menée en 2015 a montré que l'application mensuelle du spot-on ADVOCATE® (moxidectine, imidaclopride) pendant six mois consécutifs permet de détruire efficacement les stades adultes et les microfilaires de *Dirofilaria repens* (Pétry et al. 2015). Cette spécialité est la seule qui dispose à l'heure actuelle de l'indication pour le « Traitement de la dirofilariose cutanée (stade adulte de *Dirofilaria repens*) » ainsi que pour la « réduction des microfilaires circulatoires ».

Cet effet de la moxidectine sur les formes adultes s'explique par son caractère lipophile (davantage que l'ivermectine) : elle se retrouve en quantité importante dans le tissu adipeux qui sert de réservoir à la molécule et contribue à sa persistance dans l'organisme. Les filaires adultes de *Dirofilaria repens* se localisent en région sous-cutanée où le tissu adipeux est abondant : elles sont donc exposées à de fortes concentrations de moxidectine sur le long terme, ce qui explique l'efficacité adulticide de cette molécule (Vanapalli et al. 2002).

Des publications plus anciennes rapportent l'utilisation de la mélarsomine à 2,5 mg/kg par voie intramusculaire profonde, 2 fois à 24h d'intervalle (Tarello et al. 2002 ; Baneth et al. 2002) comme traitement adulticide de *Dirofilaria repens* mais l'efficacité de cette molécule n'a pas été validée par des études cliniques à l'heure actuelle (Pétry et al. 2015).

L'effet microfilaricide des lactones macrocycliques autres que la moxidectine a également été étudié, avec des résultats variables:

- Il apparaît que l'administration mensuelle d'ivermectine à la dose de 6 µg/kg n'est pas aussi efficace contre les microfilaires de *Dirofilaria repens* que contre celles de *Dirofilaria immitis* (Venco et al. 2004). La combinaison de l'ivermectine à cette même dose administrée tous les 15 jours pendant 6 mois et de doxycycline à 10 mg/kg SID

pendant 1 mois permet en revanche d'éliminer les microfilaires de *Dirofilaria repens* (Gianelli et al. 2013).

- La sélamectine, administré 1 à 2 fois par mois pendant 8 à 12 mois a démontré partiellement son efficacité microfilaricide : 65% des chiens étaient amicrofilarémiques et les autres présentaient des concentrations en microfilaires basses (Jacsó et al. 2010).

Dans le cas où des nodules cutanés contenant des filaires adultes sont présents, ils peuvent être retirés chirurgicalement. Notons néanmoins que ce procédé ne permet généralement pas d'éliminer l'intégralité des vers adultes, certains résidant dans les tissus plus profonds.

ii. Prévention de la dirofilariose sous-cutanée à *Dirofilaria repens*

La prévention de l'infestation passe d'une part par la lutte contre les piqûres de moustiques vecteurs et d'autre part par l'utilisation de lactones macrocycliques. Du fait du faible pouvoir pathogène de ce parasite, il est très peu fréquent qu'une chimioprévention soit mise en œuvre.

La moxidectine en formulation orale, injectable (GUARDIAN®SR) et en spot-on (ADVOCATE®) a montré son efficacité pour la prévention de l'infestation par *Dirofilaria repens* (Rossi et al. 2002 ; Genchi et al. 2010 ; Genchi et al. 2013). Certaines spécialités vétérinaires dont le principe actif est la moxidectine possèdent une AMM qui inclue la prévention de la dirofilariose cutanée à *Dirofilaria repens* dans ses indications. C'est le cas de l'ADVOCATE® et du GUARDIAN®SR injectable.

L'efficacité d'autres molécules de la famille des lactones macrocycliques a été validée par des publications mais les spécialités vétérinaires disponibles ne disposent pas de cette indication.

Des études ont démontré l'efficacité de l'administration mensuelle d'ivermectine (associée au pyrantel) d'une part (Pollono et al. 1998) et de la sélamectine en spot-on d'autre part (Genchi et al. 2002) pour la prévention de l'infestation par *Dirofilaria repens*.

La milbémycine oxime s'est également révélée efficace dans la prévention de la dirofilariose sous-cutanée : aucun des chiens du groupe recevant la spécialité MILBEMAX® 1 fois par mois à la dose de 0,5 mg/kg de milbémycine oxime (n=111) n'a présenté de microfilaires sanguines contre 6 chiens sur les 114 du groupe témoin (Di Cesare et al. 2014).

b) Acanthocheilonema reconditum et Acanthocheilonema dracunculoides

Les infestations par *Acanthocheilonema reconditum* et *Acanthocheilonema dracunculoides* font le plus souvent l'objet d'une découverte fortuite avec la mise en évidence de leurs microfilaires au frottis sanguin. Il est de fait important de différencier leurs microfilaires de celles de *Dirofilaria immitis*.

Peu de données sont disponibles en termes de traitement contre ces parasites, notamment du fait de leur faible impact pathogène. Une publication de 2013 suggère que le spot-on ADVOCATE® (moxidectine, imidaclopride) présente un intérêt dans la prévention de l'infestation par *Acanthocheilonema reconditum* : d'une part, en évitant l'infestation par les puces vectrices de ce parasite, et d'autre part en éliminant les larves infestantes (Traversa et al. 2013).

c) Cercopithifilaria spp.

Aucun traitement n'est mis en place lors d'infestation par des parasites du genre *Cercopithifilaria* du fait de leur faible impact pathogène et de l'absence de potentiel zoonotique. En revanche, une infestation indique que le chien est exposé aux piqûres de la tique *Rhipicephalus sanguineus*, vectrice de la parasitose et peut nous inciter à rechercher d'autres affections vectorisées par celle-ci telles que la babésiose à *Babesia vogeli*, l'anaplasmose à *Anaplasma platys* et l'hépatozoonose à *Hepatozoon canis* (Ramos et al. 2014). Notons que dans le cas où des microfilaires avaient été retrouvées dans le liquide synovial d'un chien souffrant de polyarthrite chronique, des traitements répétés avec de la milbémycine oxime n'avaient permis aucune amélioration clinique de l'animal (Gabrielli et al. 2014).

La prévention de l'infestation passe par le traitement antiparasitaire externe pour prévenir les piqûres de la tique *Rhipicephalus sanguineus*.

d) Onchocerca lupi

Le seul traitement lorsque le parasite est à l'origine d'une atteinte du globe oculaire est le retrait chirurgical du nodule contenant le vers. Dans les cas où un abcès rétrobulbaire est présent, l'énucléation peut être envisagée.

Après la chirurgie, il est nécessaire de recourir à un traitement filaricide avec de la mélarsomine pour éviter que d'éventuels vers présents dans le tissu péri-oculaire ou ailleurs

ne puissent entraîner des récurrences des signes oculaires (Sréter et Széll. 2008). Il est conseillé d'administrer des glucocorticoïdes dans les deux semaines qui suivent la chirurgie. L'utilisation de la doxycycline est également envisageable.

Un traitement larvicide avec des lactones macrocycliques est à mettre en place dans les cas où les microfilaries entraînent des manifestations cutanées. L'ivermectine est alors la molécule de choix pour éliminer les microfilaries (Sréter et Széll. 2008).

La prévention de l'infestation passe par la lutte contre les vecteurs (*simulies et Culicoides*). Aucun traitement chimiopréventif n'est disponible.

Partie 2 : Partie expérimentale

Mise en place d'une méthode de diagnostic moléculaire par PCR quantitative pour détecter et identifier les microfilaires sanguines de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* chez le chien

I. Objectifs de l'étude expérimentale

Le diagnostic moléculaire n'est aujourd'hui pas disponible en routine pour détecter les microfilaires sanguines des espèces *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens* chez le chien. Pourtant, la sensibilité des méthodes utilisant la microscopie photonique est bien moindre et la différenciation des espèces de microfilaires doit se faire au moyen d'une coloration histochimique, ce qui est une méthode fastidieuse et chronophage pour l'opérateur.

L'objectif de ce travail est de mettre au point une PCR quantitative duplex qui détecte, à partir d'un prélèvement de sang périphérique, les microfilaires des deux principales espèces de filaires rencontrées chez le chien en France : *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens*. Cette méthode diagnostique permettra alors de savoir si l'animal est infesté ou non par des microfilaires et d'en déterminer l'espèce.

Nos travaux s'appuient sur des études menées en 2012 par Latrofa et al. à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Bari en Italie, décrivant des amorces capables de s'hybrider à l'ADN mitochondrial du cytochrome oxidase 1 (cox1) de *Dirofilaria immitis* d'une part, et des amorces s'hybridant avec une région de l'ADN nucléaire ribosomal de l'internal transcribed spacer 2 (ITS-2) de *Dirofilaria repens* d'autre part.

Les expériences préliminaires ont eu pour but d'adapter les protocoles décrits dans la bibliographie aux moyens dont nous disposions à l'ENVV et de valider le bon déroulement des réactions de qPCR avec les témoins positifs (ADN extrait de filaires adultes des deux espèces).

Dans un second temps, des prélèvements sanguins ont été réalisés sur des chiens susceptibles d'être infestés par l'une de ces deux espèces de parasites et ce, en France métropolitaine et dans les DOM-TOM. Pour chaque échantillon de sang prélevé sur tube EDTA, trois tests diagnostics ont été réalisés :

- Une recherche des microfilaires avec le kit commercial Filarassay® (méthode par filtration).
- Un test rapide de détection des antigènes solubles de *Dirofilaria immitis* avec le Snap 4DX® d'IDEXX.
- Une qPCR duplex après extraction de l'ADN avec le kit QIAGEN « QIAamp® DNA Mini Kit ».

II. Matériels et méthodes

1) Recrutement des chiens et modalités de prélèvements

65 échantillons sanguins de chiens prélevés sur EDTA ont été analysés dans cette étude.

Ces prélèvements proviennent de chiens présentés en consultation dans des cliniques vétérinaires de la Réunion, de Guadeloupe, de Nouvelle-Calédonie, du sud de la France et des cliniques de l'ENVT ainsi que d'un refuge du sud-est de la France, à Flayosc dans le Var et de refuges de l'île de la Réunion.

Pour chaque chien inclus dans l'étude, une fiche de consentement éclairé signée par les propriétaires et un formulaire d'accompagnement, précisant le signalement du chien (sexe, âge, race), son lieu de vie, ses déplacements éventuels en zones endémiques et ses traitements antiparasitaires internes et externes (Annexe 1) sont joints au prélèvement.

a) Principes de recrutement des chiens

Les chiens sélectionnés pour intégrer notre étude ont été choisis pour leur forte probabilité d'être infestés par *Dirofilaria immitis* ou par *Dirofilaria repens*. Nos critères de sélection diffèrent en fonction du lieu de vie des animaux (France, Corse ou DOM-TOM) et de la prévalence de la parasitose dans chaque région géographique.

▪ Pour les chiens résidant en France métropolitaine :

Les chiens inclus dans notre étude sont ceux :

- Présentant des signes cliniques compatibles avec l'une des formes de la maladie (forme cardio-pulmonaire pour *Dirofilaria immitis*, forme cutanée pour *Dirofilaria repens*),
- Ou chez lesquels des microfilaries ont été détectées de manière fortuite sur un frottis sanguin,
- Ou avec un test rapide de détection des antigènes solubles de *Dirofilaria immitis* positif,
- Ou provenant d'un refuge SPA dans une zone endémique du Sud-Est de la France.

▪ Pour les chiens résidant dans les DOM-TOM (La Réunion, Nouvelle-Calédonie, Guadeloupe) :

Les critères d'inclusion dans notre étude sont beaucoup moins restrictifs dans la mesure où la prévalence de la dirofilariose cardio-pulmonaire est nettement plus importante dans les DOM-

TOM qu'en France métropolitaine. Les chiens avec des signes cliniques compatibles avec l'une des formes de la maladie, avec des microfilaries sanguines ou avec un test sérologique rapide positif pour la dirofilariose sont ceux recherchés en priorité.

Néanmoins, les chiens asymptomatiques ne sont pas exclus à condition qu'ils remplissent certains critères qui augmentent la probabilité d'une éventuelle infestation : ils doivent être adultes (plus d'un an), ne pas recevoir de traitement préventif de la dirofilariose (lactones macrocycliques) ni d'antiparasitaire externe actif contre les moustiques (pyréthrinoïdes). Les chiens errants constituent généralement de bons candidats.

b) Modalités de recrutement des chiens

Pour recruter les chiens pour notre étude, différents moyens ont été mis en œuvre impliquant la participation de vétérinaires praticiens et la réalisation de prélèvements dans des refuges SPA.

- Prise de contact avec des vétérinaires praticiens travaillant en zone endémique par email : 213 structures vétérinaires ont été directement contactées dans 3 départements du Sud-Est de la France (le Var, les Bouches-du-Rhône et les Alpes-Maritimes), 22 structures vétérinaires en Corse et 95 dans les DOM-TOM.
Seuls les vétérinaires praticiens des DOM-TOM nous ont fait parvenir des prélèvements : 30 proviennent de la Réunion, 4 de Guadeloupe et 12 de Nouvelle-Calédonie. Les taux de réponses aux mails et de participation sont reportés dans l'Annexe 2.
- Prélèvements directement réalisés dans le refuge de Flayosc dans le département du Var. La vétérinaire responsable du refuge a accepté de nous recevoir sur place afin de réaliser des prélèvements sur 15 chiens sélectionnés parmi les chiens du refuge selon des critères épidémiologiques (âge, provenance).
- Prise de contact avec le Service de Médecine interne de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse ainsi qu'avec la Clinique vétérinaire du Vernet (31). Ces deux structures ont été informées de ce travail de thèse et ont fait parvenir des prélèvements de chiens présentant des microfilaries au frottis sanguins ou avec des signes cliniques évocateurs d'une infestation (2 pour l'ENVT ; 2 pour la Clinique vétérinaire du Vernet)
- Annonce déposée sur le site web vetofocus.com : Aucun prélèvement n'a été récolté par ce biais.

c) **Profil des chiens inclus dans l'étude**

Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche descriptive avec le signalement de l'animal et les commémoratifs. Ces données sont résumées dans les graphiques de la Figure 54.

Les informations exhaustives sur les chiens inclus dans l'étude figurent dans l'Annexe 3.

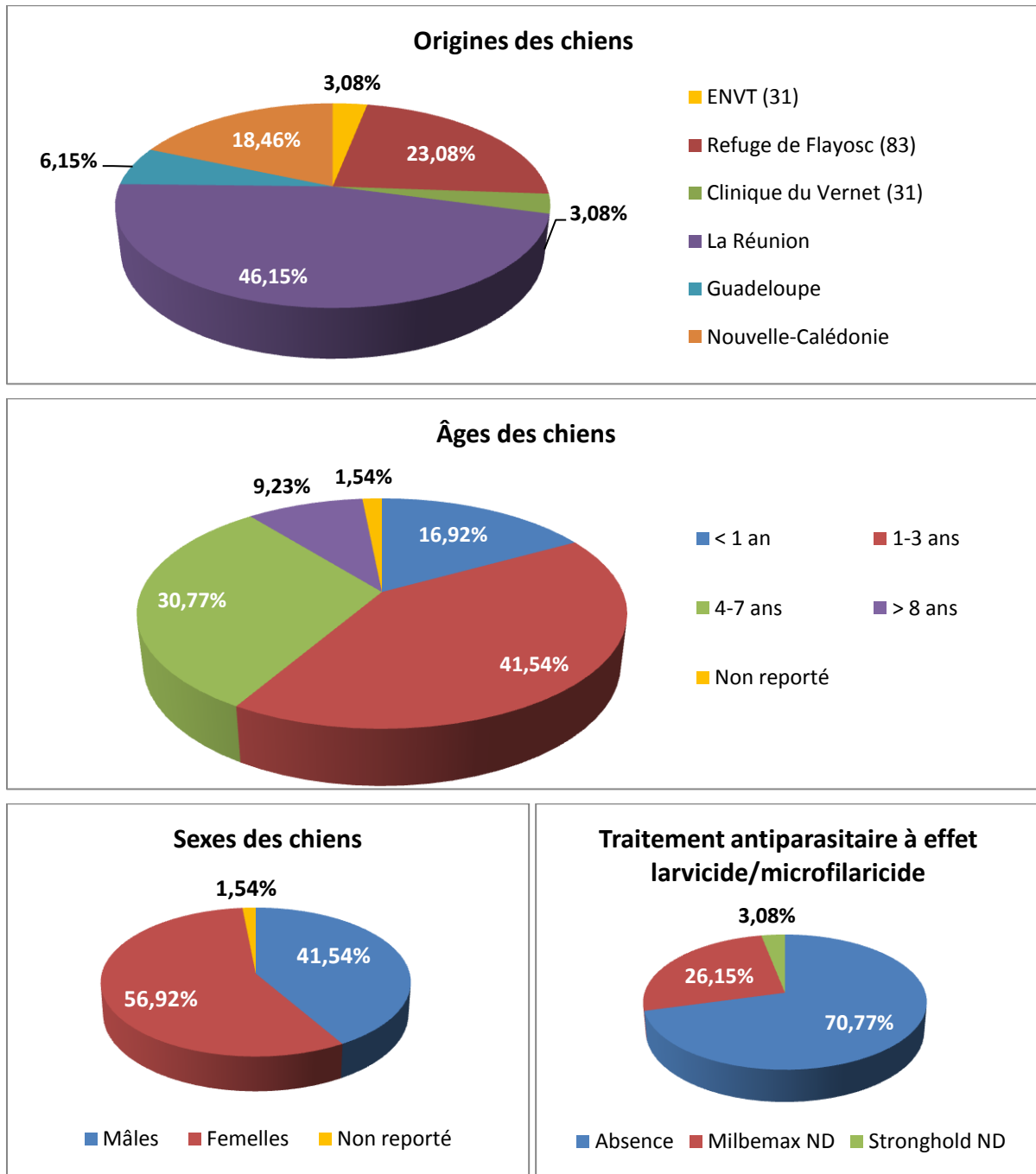


Figure 54 : Origine et profil épidémiologique des chiens dont le sang a été prélevé pour l'étude

d) Modalités de prélèvement

Pour les chiens répondant aux critères précédemment définis, un prélèvement de sang sur **tube EDTA** a été réalisé. La quantité minimale de sang prélevé est de 3mL par chien.

Le site de prélèvement (veine jugulaire, veine céphalique ou veine saphène externe) n'est pas imposé au vétérinaire réalisant la prise de sang, de même que l'heure de prélèvement.

e) Conservation et envoi des échantillons

Après prélèvement sur tube EDTA, deux possibilités sont envisageables pour les vétérinaires praticiens pour conserver le sang avant de le transférer au Laboratoire de Parasitologie de l'ENVT.

La première possibilité est de conserver le tube de sang total sur EDTA au réfrigérateur (4-8°C) et le faire parvenir à l'ENVT dans un délai de 7 jours. L'autre possibilité qui s'impose pour les prélèvements réalisés dans les DOM-TOM est de conserver le tube de sang total sur EDTA au congélateur à -20°C.

Les échantillons réfrigérés ou congelés sont transmis par colis postaux en express et sont préalablement emballés dans des pains de glace pour optimiser la conservation. Le transport dans des conditions réfrigérées ou congelées a été envisagé mais cette option n'a pu être retenue pour des raisons logistiques et financières.

2) Méthodes diagnostiques

a) Recherche des microfilaires avec la méthode par filtration

(Kit commercial Filarassay®)

La méthode par filtration (kit commercial Filarassay®) nécessite préalablement l'hémolyse d'1mL de sang, sans laquelle les hématies se retrouveraient également arrêtées par le filtre, ce qui fausserait la lecture.

L'hémolyse est réalisée en mélangeant 1mL de sang avec 9mL d'eau distillée et en les réfrigérant à 8°C pendant 10 minutes. Le mélange obtenu est ensuite placé dans une seringue et poussé à travers une membrane filtrante de polycarbonate avec des pores de 3 µm de diamètre. Le filtre retient les microfilaires et laisse passer les diverses particules du sang.

Un rinçage avec 5mL d'eau distillée est réalisé pour éliminer les hématies qui seraient restées dans le filtre et ainsi faciliter la lecture. Le filtre est ensuite déposé sur une lame.

L'observation microscopique aux grossissements x100 et x400 permet la mise en évidence directe des microfilaires.



Figure 55 : Illustration d'un test Filarassay® réalisé au laboratoire de parasitologie de l'ENVT
Crédit photographique : J. Semat



Figure 56 : Observation de microfilaires de *Dirofilaria immitis* au microscope photonique au grossissement x 400

Crédit photographique : J. Semat

b) Test rapide de détection des antigènes solubles de *Dirofilaria immitis*

Le choix du test sérologique rapide qui permet la détection des antigènes circulants synthétisés par les filaires adultes femelles de *Dirofilaria immitis* s'est porté sur le **Snap 4DX®** des laboratoires IDEXX.

Il s'agit d'un test performant avec une sensibilité de 99,2% et une spécificité de 100% pour la détection de l'infestation par *Dirofilaria immitis* d'après les données du fabricant. Il ne permet cependant pas d'évaluer le niveau d'infestation : seul le Snap® Dirofilariose IDEXX permet cette évaluation semi-quantitative de la charge antigénique.

Notons que le test Snap 4DX® permet également de détecter les anticorps dirigés contre *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* et *Ehrlichia ewingii* dans le prélèvement.



Figure 57 : Réalisation des Snap 4DX® au laboratoire de parasitologie de l'ENVT
Crédit photographique : J. Semat

Le test Snap 4DX® est réalisé à partir de sang total réfrigéré dans la mesure du possible ou à partir de sang total congelé qui a été préalablement décongelé quand le prélèvement provient des DOM-TOM.

c) PCR quantitative duplex

i. Extraction de l'ADN

Pour chaque série d'extraction effectuée, un témoin d'extraction noté HEX est obtenu en réalisant le protocole d'extraction sur de l'eau (stérile, RNases et DNases free, protéases free).

▪ Extraction de l'ADN à partir des échantillons de sang

L'ADN génomique est extrait à partir d'1mL de chaque échantillon de sang total sur EDTA après décongélation dans le cas où le prélèvement était conservé au congélateur.

Le kit d'extraction utilisé est le kit QIAGEN « QIAamp® DNA Mini Kit », qui utilise la technologie basée sur la silice, où les membranes de silice liant spécifiquement l'ADN sont empaquetées dans des colonnes de centrifugation.

Les premières étapes consistent en une lyse cellulaire, une lyse des membranes lipidiques et une dénaturation protéique. L'ADN est ensuite absorbé spécifiquement sur la membrane de silice. Les contaminants cellulaires sont éliminés par les différentes étapes de lavage. L'ADN est finalement élué dans un tampon d'éluion.

Le protocole exhaustif est détaillé dans l'Annexe 4.

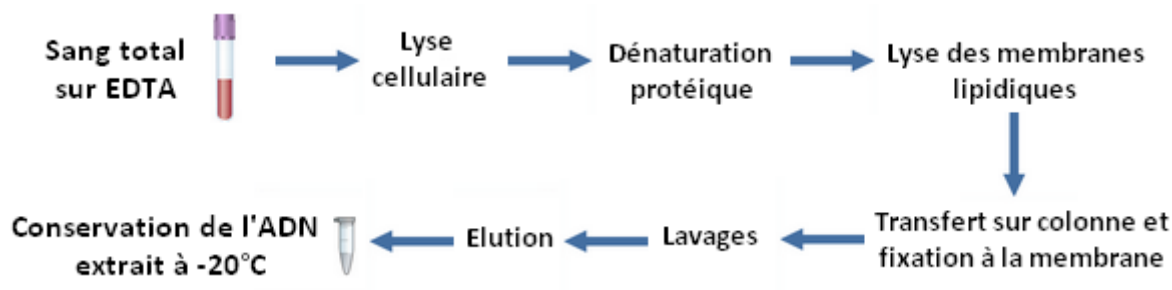


Figure 58 : Protocole simplifié de la méthode d'extraction de l'ADN avec le kit QIAGEN « QIAamp® DNA Mini Kit », qui utilise la technologie basée sur la silice. Crédit Illustration : J. Semat

Le produit obtenu (environ 200µL) est stocké au congélateur à -20°C jusqu'à la réalisation de la PCR en temps réel.

▪ Extraction de l'ADN à partir des fragments de filaires adultes

Des extractions d'ADN ont été réalisées à partir des fragments de filaires adultes provenant de la Faculté de médecine vétérinaire de Cluj-Napoca en Roumanie en vue d'obtenir des témoins positifs.

Dans la mesure où les parasites étaient conservés dans l'alcool, une étape préalable de rinçage à l'eau distillée était nécessaire pour éviter l'inhibition de la qPCR par l'éthanol (Schrader et al. 2012).

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'un fragment de 0,05 grammes de *Dirofilaria immitis* et de 0,035 grammes de *Dirofilaria repens* (qui correspond à la totalité du matériel reçu pour cette dernière). Le kit d'extraction utilisé est le kit QIAGEN « QIAamp® DNA Mini Kit » en respectant le protocole classiquement utilisé pour la peau ou les organes (Annexe 4).

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

La Polymérase Chain Réaction (PCR) est un procédé d'amplification moléculaire de l'ADN. La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité de fragments d'ADN amplifiés (ou amplicons) générés pendant la réaction de PCR. Il existe deux méthodes de détection quantitative des amplicons : les sondes fluorescentes et les agents intercalant se liant à l'ADN double brin (SYBR Green®, EvaGreen®).

Dans ce travail de thèse, les réactions de qPCR font intervenir un agent intercalant : l'EvaGreen®. Cette molécule émet une fluorescence intense lorsqu'elle est liée à l'ADN double brin et aucune fluorescence sous sa forme libre en solution. Ainsi, plus il y a d'ADN amplifié, plus il y a de molécules fluorescentes fixées et plus la fluorescence émise est importante.

La réaction de qPCR est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN à amplifier (ADN matrice), l'ADN polymérase, les amorces, les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) en excès et les molécules fluorescentes. Ce mélange est soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans un thermocycleur.

Chaque cycle comprend trois étapes : 1) la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin par la chaleur, 2) l'hybridation des amorces par diminution de la température sous leur température d'hybridation, 3) l'élongation des amorces par une ADN polymérase thermostable.

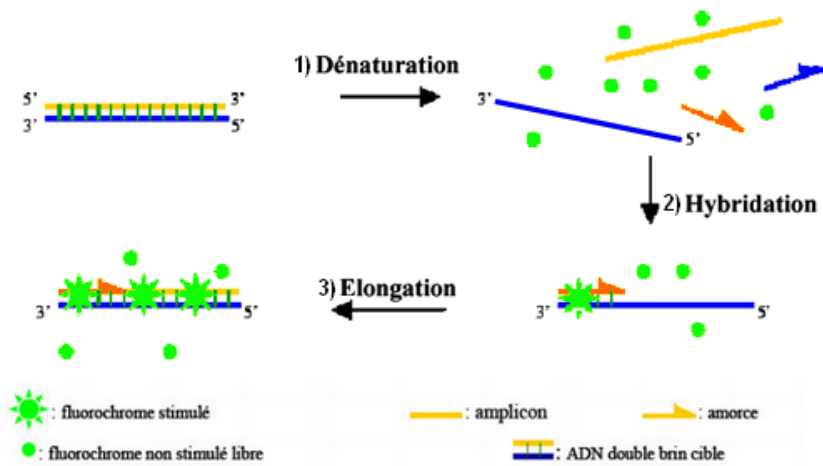


Figure 59 : Principe de la PCR quantitative utilisant un agent fluorescent se liant à l'ADN double brin (EvaGreen®). D'après Poitras et Houde, 2002

Les valeurs de fluorescence émises sont enregistrées à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles et permettent de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction de qPCR (Poitras et Houde, 2002). Au cours des cycles, la fluorescence émise augmente proportionnellement au nombre de copies et est donc directement liée à la quantité initiale et au nombre de cycles de PCR.

Il existe un cycle seuil (Ct ou Cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour obtenir un signal fluorescent significatif par rapport au bruit de fond. Ce Ct apparaît toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Il est inversement proportionnel au logarithme de base 2 du nombre de copies initiales présentes de la cible dans le milieu réactionnel. Ainsi, plus le Ct d'un échantillon est petit, plus le nombre de copies initiales de l'ADN matrice est important.

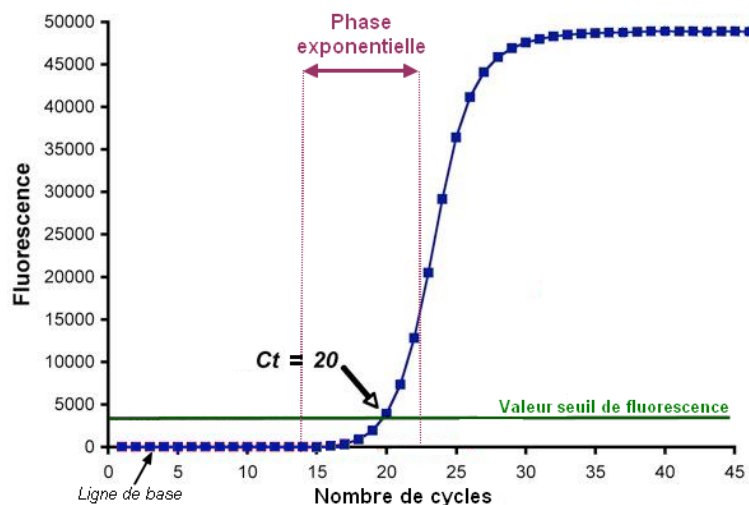


Figure 60 : Courbe d'amplification de la PCR en temps réel. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

Crédit Illustration : J. Semat

L'EvaGreen® (de même que le SYBR Green®) est applicable à tout couple d'amorces et permet de fournir un signal fort, d'autant plus que la taille du fragment d'ADN à amplifier est importante.

Cette méthode présente néanmoins le désavantage de n'être pas spécifique de l'amplicon d'intérêt : il arrive que les amorces forment des dimères ou qu'une séquence non ciblée soit amplifiée dans le cas où les amorces de la qPCR sont peu spécifiques.

Pour vérifier que c'est bien le gène recherché qui a été amplifié, il faut évaluer la température de fusion T_m (melting temperature). Chaque produit d'amplification est en effet caractérisé par une température T_m spécifique qui correspond à la température pour laquelle 50% de l'ADN double brin est dissocié. Le T_m d'un produit d'amplification s'évalue sur la courbe de dissociation ou courbe de fusion qui est obtenue en traçant la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température.

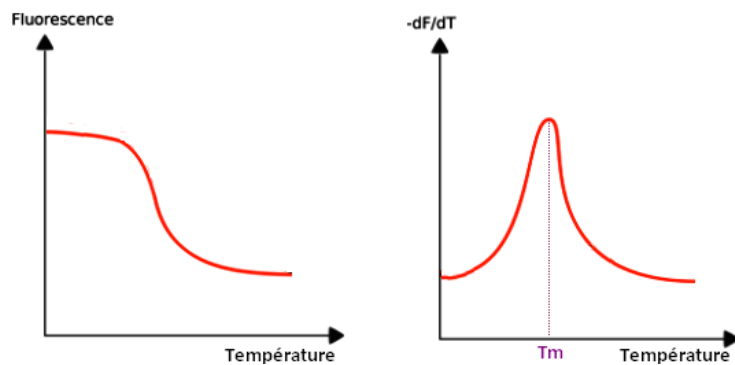


Figure 61 : Représentation schématique de l'évolution de la fluorescence en fonction de la température (à gauche) et de la courbe de dissociation d'une réaction de qPCR (à droite). La température de fusion d'un double brin correspond à un pic sur cette courbe. Crédit Illustration : J. Semat

La présence de dimères d'amorces ou d'amplicons aspécifiques dont le T_m est suffisamment différent du T_m de l'amplicon d'intérêt peut être détectée grâce à la courbe de dissociation par la présence de pics surnuméraires.

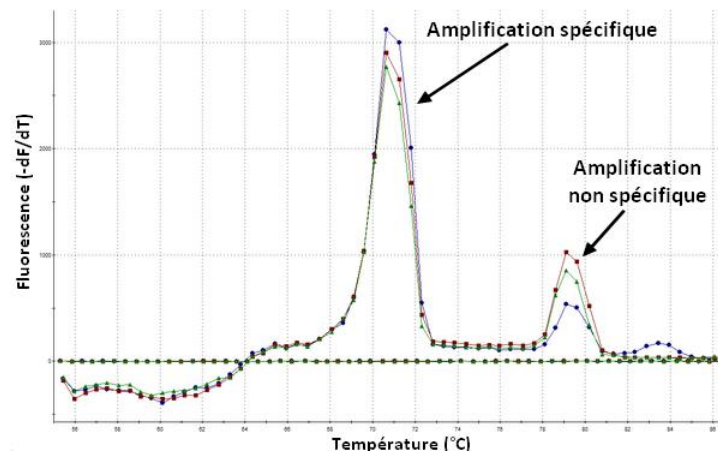


Figure 62 : Courbe de dissociation obtenue à l'issue d'une réaction de qPCR qui illustre la présence d'une séquence amplifiée non spécifique. Crédit Illustration : J. Semat

iii. Témoins positifs et Témoin négatif

Les témoins positifs de notre étude sont des échantillons d'ADN extraits de filaires adultes de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens*.

Pour les expériences préliminaires qui ont permis de valider le protocole, le Docteur Domenico OTRANTO, professeur à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Bari en Italie nous a gracieusement fait parvenir des échantillons d'ADN extrait de chacune des deux espèces de filaires.

Cette quantité d'ADN étant trop faible pour réaliser l'ensemble des qPCR sur les chiens recrutés, il était nécessaire de trouver de nouveaux témoins positifs : dans cet objectif, des fragments de filaires adultes de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* ont été envoyés par les Docteurs Angela IONICA et Loredana POP de la Faculté de médecine vétérinaire de Cluj-Napoca en Roumanie.

L'extraction de l'ADN a été réalisée au Laboratoire de Parasitologie de l'ENVT et les extraits obtenus ont été dilués au 1/10^{ème} afin de servir de témoins positifs pour l'ensemble des qPCR.

Le témoin négatif de la qPCR est un échantillon obtenu après extraction d'ADN à partir de sang sur EDTA prélevé sur un chien de race Beagle issu du Service de Parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. Ce chien est en bonne santé. Il est élevé dans un chenil en intérieur et est de fait peu exposé aux moustiques vecteurs des parasites recherchés. Sur son prélèvement de sang, aucune microfilarie circulante n'a été mise en évidence avec la méthode Filarassay® et le test SNAP 4DX® s'est révélé négatif.

iv. ADN Matrice et amorces de la qPCR

La réalisation de la PCR quantitative nécessite l'intervention d'un couple d'amorces (sens et anti-sens) s'hybridant à une séquence d'ADN matrice spécifique de chacune des espèces de filaires, séquence qui sera alors amplifiée et détectée.

Pour *Dirofilaria immitis*, l'ADN matrice correspond à une région (~200 paires de bases) de la sous unité 1 du gène du cytochrome C oxidase mitochondrial (cox1).

Tableau 12 : Amorces utilisées pour la détection de l'ADN de *Dirofilaria immitis*, d'après Latrofa et al. 2012

Noms de l'amorce sens et anti-sens	Séquence de l'amorce sens et anti-sens	Longueur du fragment amplifié
DI COI-F1	5'-AGT GTA GAG GGT CAG CCT GAG TTA-3'	200 bp
DI COI-R1	5'-ACA GGC ACT GAC AAT ACC AAT-3'	

Pour *Dirofilaria repens*, l'ADN matrice est un fragment (~300 paires de bases) de l'espace interne transcrit 2 (ITS-2) de l'ADN ribosomal.

Tableau 13 : Amorces utilisées pour la détection de l'ADN de *Dirofilaria repens*, d'après Latrofa et al. 2012

Noms de l'amorce sens et anti-sens	Séquence de l'amorce sens et anti-sens	Longueur du fragment amplifié
Dr ITS2-F	5'-CAT TGA TAG TTT ACA TTC AAA TAA-3'	300 bp
Dr ITS2-R	5'-GAT TCA TTT ATT GCA TTA AGC AAG C-3'	

Les couples d'amorces utilisés dans cette étude sont repris d'un article publié par Latrofa et al. en 2012 et s'hybrident à des régions de l'ADN spécifiques d'espèces et conservées au sein d'une même espèce.

Il a été démontré que les séquences des amplicons obtenus lors des réactions de qPCR menées avec ces amorces correspondaient à 99-100% aux séquences de référence disponibles dans GenBank pour les espèces *Dirofilaria immitis* (JF461464) et *Dirofilaria repens* (AY693808) (Latrofa et al. 2012).

La spécificité des couples d'amorces a par ailleurs été vérifiée dans le cadre de ce travail de thèse par la réalisation de PCR simplex (un seul couple d'amorces) à partir des témoins positifs (vers adultes de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* identifiés selon leurs

caractéristiques morphologiques). Les séquences amplifiées ont par la suite été purifiées au Laboratoire de Parasitologie de l'ENVT selon le protocole présenté en Annexe 6 et séquencées au plateau de génome et transcriptome GeT-Purpan (Institut Fédéral pour la Recherche Bio-Médicale, Toulouse, France). Le séquençage a été réalisé à l'aide du kit ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.0 kit (Applied Biosystems, Villebon Sur Yvette, France) et du séquenceur Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Villebon Sur Yvette, France).

Les séquences obtenues ont été nettoyées à l'aide du logiciel Sequence Scanner Software v2.0 (Applied Biosystems, Villebon Sur Yvette, France). Elles ont ensuite été soumises à une analyse de leur spécificité in silico avec le logiciel BLASTn (<http://balst.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

v. Protocole pour la PCR en temps réel

▪ Mise en plaque de la qPCR

Les réactions sont menées dans un volume total de 20 µL dont 16 µL de mélange réactionnel « Mix » pour la qPCR et 4 µL de solution contenant les extraits d'ADN, ajoutée au mélange réactionnel en dernier. Tous les composants intervenant dans la réaction sont préalablement décongelés.

Le mélange réactionnel « Mix » déposé dans chaque puits contient :

- 5 µL d'eau stérile, RNases et DNases free, protéases free.
- 7 µL de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Ce mélange contient tous les composants nécessaires à la synthèse nucléotidique à l'exception des amorces : les molécules fluorescentes EvaGreen® (mêmes propriétés que le SYBR®Green), l'ADN Polymérase et les dNTPs.
- 1 µL d'une solution d'amorce DI COI-F1 diluée au 1/20^{ème} par rapport à la solution mère à 100 µM soit 5 pmol d'amorce DI COI-F1 par puits.
- 1 µL d'une solution d'amorce DI COI-R1 diluée au 1/20^{ème} par rapport à la solution mère à 100 µM soit 5 pmol d'amorce DI COI-R1 par puits.
- 1 µL de la solution mère d'amorce Dr ITS2-F (à 100 µM) soit 100 pmol par puits.
- 1 µL de la solution mère d'amorce Dr ITS2-R (à 100 µM) soit 100 pmol par puits.

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des composants intervenants dans la PCR quantitative duplex

Réactifs de la PCR quantitative	Dans chaque puits
Eau Free	5 µl
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	7 µl
Amorce COI-F1 (5 pmol) <i>Pré-dilution au 1/20ème</i>	1 µl
Amorce COI-R1 (5 pmol) <i>Pré-dilution au 1/20ème</i>	1 µl
Amorce ITS2- F (100 pmol) <i>Solution mère</i>	1 µl
Amorce ITS2-R (100 pmol) <i>Solution mère</i>	1 µl
Solution contenant l'ADN extrait	4 µl
<i>Volume total</i>	20 µl



Les plaques utilisées sont des plaques Thermo Scientific AB-0600. Les bouchons employés pour fermer les plaques sont des bouchons Thermo Scientific AB-0866.

Figure 63 : Microplaques PCR 96 puits Thermo Scientific AB-0600

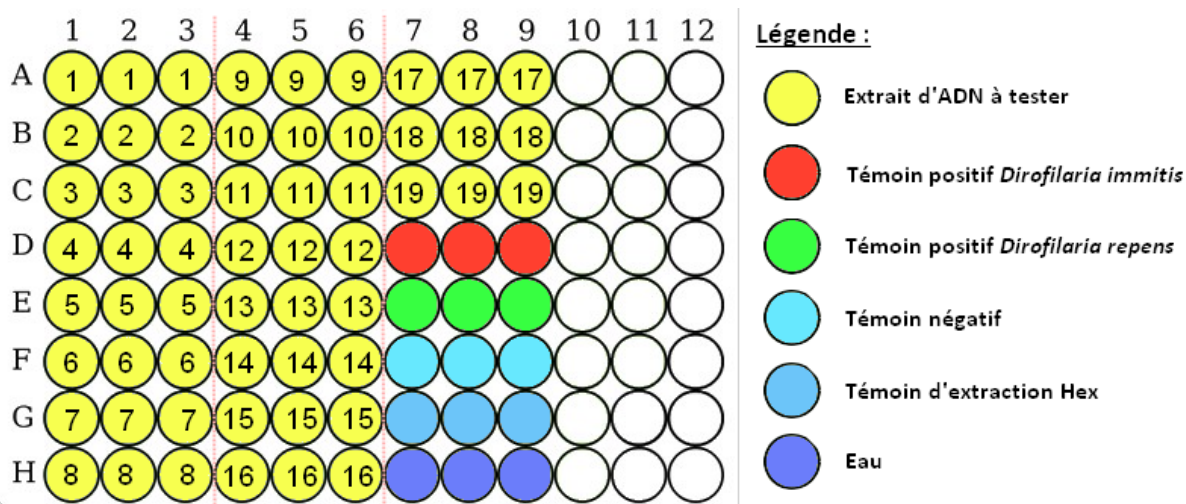


Figure 64 : Représentation schématique d'un plan de plaque de la qPCR avec 19 échantillons à tester

Pour chaque run de qPCR effectuée pour rechercher l'ADN de microfilaries sur des échantillons de sang à tester, il faut obligatoirement inclure les témoins suivants sur la plaque :

- L'ADN extrait de filaires de *Dirofilaria immitis* (témoin positif).
- L'ADN extrait de filaires de *Dirofilaria repens* (témoin positif).
- L'ADN extrait du sang de chien non parasité (témoin négatif).
- Le témoin HEX qui témoigne de l'absence de contamination lors du procédé d'extraction.
- De l'eau (stérile, RNases et DNases free, protéases free) qui témoigne de l'absence de contamination du Mix.

Chaque réaction est réalisée en triplicata. Les trois puits successifs de la même ligne correspondent à la même réaction et doivent en théorie fournir des résultats similaires : si ce n'est pas le cas, il faut se poser la question de la possibilité d'une erreur de manipulation ou de la contamination par l'ADN des puits voisins.

Les témoins positifs, le témoin négatif, le témoin d'extraction Hex et l'eau permettent de valider le bon déroulement de la réaction de qPCR. Un signal doit être obtenu pour les témoins positifs de chacune des deux espèces avec des températures de fusion T_m cohérentes avec les données bibliographiques et un nombre de cycles nécessaires pour positiver la qPCR (Ct ou Cycle Threshold) suffisamment bas. En revanche, aucun signal ne doit être détecté pour le témoin négatif, le témoin d'extraction Hex et l'eau. Dans le cas inverse, il faut suspecter une éventuelle contamination des puits lors de la mise en plaque ou lors de l'extraction de l'ADN (si c'est le témoin d'extraction Hex qui est positif).

Pour chaque échantillon sanguin de chien, la réaction de qPCR est menée à partir de l'extrait d'ADN pur et à partir de la dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de cet extrait d'ADN.

▪ Précautions lors des manipulations

Le principal enjeu est d'éviter les contaminations des puits par de l'ADN qui se retrouverait dans un mauvais puits par une erreur de manipulation, du matériel usagé réutilisé par mégarde ou par des projections entre échantillons. Le risque est alors d'obtenir des résultats faussement positifs.

- Le port d'une blouse propre et de gants pour le manipulateur est obligatoire. Le port de gants est d'autant plus important pour la manipulation des microplaques car le film gras présent sur la peau peut fausser le scannage optique et erroner l'interprétation informatisée des résultats.

- Les cônes à filtres sont à usage unique et sont jetés après chaque utilisation.

- Les différentes étapes ont lieu sur des postes de travail séparés : un sert à l'extraction de l'ADN, un autre sert à la préparation du mélange réactionnel et un troisième est réservé au thermocycleur.

- Un nettoyage minutieux des paillasse est réalisé après chaque manipulation.

- Programme d'amplification de la qPCR

La PCR quantitative est réalisée avec le Thermocycleur Stratagene MX3005P (Agilent Technologies, Jolla La, CA). Le programme d'amplification est défini par une succession de cycles de dénaturation, d'hybridation, et d'élongation et s'appuie sur l'étude menée en 2012 par Latrofa et al. Il consiste en :

1. Une première étape dite « hot-start » de chauffage à 95°C pendant 10 minutes (dénaturation de l'ADN)

2. 40 cycles de 2 étapes :

- Chauffage à 95°C pendant 15 secondes (dénaturation de l'ADN)

- Hybridation-élongation à 60°C pendant 1 minute

La courbe de dissociation est obtenue par chauffage à 95°C pendant 20 secondes puis refroidissement à 55°C pendant 20 secondes et réchauffage lent à 95°C par palier de 0,5 °C.

- Traitement informatisé des données

Les résultats sont analysés avec le logiciel MxPro QPCR (version 4.10).

- Exploitation des résultats et approche statistique

Les résultats des réactions de qPCR menées sur les échantillons sanguins vont permettre d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la méthode de qPCR en comparaison aux différents tests diagnostiques disponibles (Filarassay®, Snap 4DX®) pour détecter une infestation par les espèces du genre *Dirofilaria* chez le chien.

Le logiciel utilisé pour l'approche statistique est **DAG_Stat** (Mackinnon. 2000). Il permet d'évaluer les performances (sensibilité et spécificité) d'un test diagnostique en comparaison à un autre test à partir de tableaux croisés et fournit des estimations de la sensibilité et de la spécificité avec un intervalle de confiance et un coefficient Kappa (K) de Cohen d'accord entre les deux tests. L'accord entre les 2 tests sera d'autant plus élevé que la valeur de Kappa est proche de 1.

III. Résultats de l'étude expérimentale

L'intégralité des résultats pour chaque animal inclus dans l'étude est détaillée dans l'[Annexe3](#).

1) Résultats du Filarassay® et du Snap 4DX® IDEXX

- Résultats du Filarassay®

Sur les 65 chiens inclus dans l'étude, 14 ont présenté un test Filarassay® positif. A l'observation au microscope photonique, entre 0 et 8 microfilaries par champs ont été observées au grossissement x100. A noter que le test Filarassay® n'a pas pu être réalisé sur 7 des chiens prélevés car la quantité de sang disponible était insuffisante.



Figure 65 : Observation microscopique d'une microfilarie de *Dirofilaria repens* (identification moléculaire à postériori) sur le prélèvement de sang du chien VI issu de la Clinique Vétérinaire du Vernet (31) par la méthode par filtration au grossissement x400. Crédit photographique : J. Semat

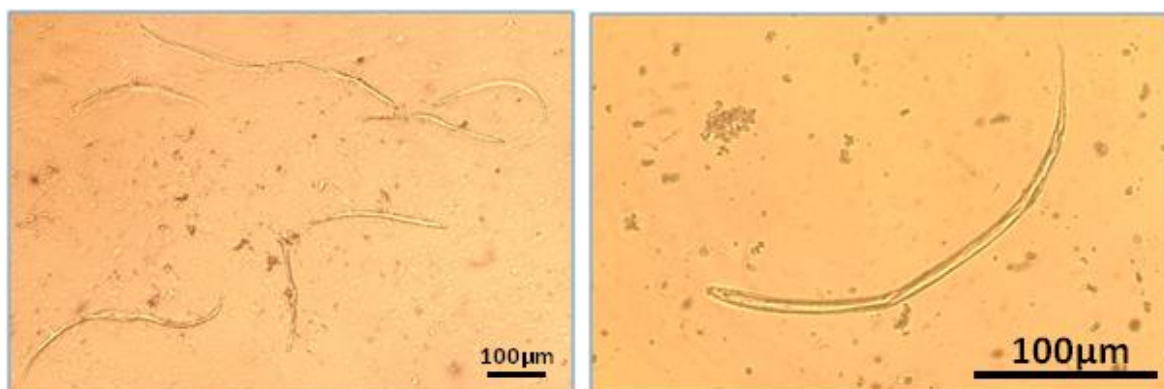


Figure 66 : Observation microscopique de microfilaries de *Dirofilaria immitis* (identification moléculaire à postériori) sur le prélèvement de sang du chien R10 provenant de la Réunion par la méthode par filtration Filarassay® au grossissement x 100 (à gauche) et x400 (à droite). Crédit photographique : J. Semat

- Résultats du Snap 4DX® IDEXX

Le Snap 4DX® s'est révélé positif pour la détection des antigènes de *Dirofilaria immitis* pour 17 chiens sur les 65 inclus dans l'étude. Tous résidaient dans les DOM-TOM. De plus, des anticorps dirigés contre *Ehrlichia canis* et/ou *Ehrlichia ewingii* ont été détectés chez 8 chiens de la Réunion dont 5 présentent également des antigènes de *Dirofilaria immitis* et un des anticorps d'*Anaplasma phagocytophilum*-*Anaplasma platys*.

Notons que le Snap 4DX® ne permet pas une évaluation semi-quantitative de la concentration en antigènes : malgré des différences notables dans l'intensité de la coloration de la pastille, aucune interprétation ne peut être formulée concernant l'antigénémie.



Figure 67 : Résultats des Snap 4DX® IDEXX sur le sang des chiens provenant de Guadeloupe
Crédit photographique : J. Semat

- Synthèse des résultats

La synthèse des résultats obtenus pour la recherche de microfaires avec le kit Filarassay® et pour la recherche d'antigènes d'excrétion-sécrétion de *Dirofilaria immitis* avec le Snap 4DX® IDEXX est présentée dans le Tableau 15 ci-dessous.

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la recherche de microfaires sanguines de *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens* avec la méthode par filtration Filarassay® et pour le Snap 4DX® d'IDEXX pour la recherche des antigènes de *Dirofilaria immitis*

		Snap 4DX® IDEXX pour la dirofilariose à <i>Dirofilaria immitis</i>		
		Positif	Négatif	Total
Kit FILARASSAY ®	Positif	11	3	14
	Négatif	6	38	44
	Non réalisé	0	7	7
	Total	17	48	65

- Onze chiens présentent un Snap 4DX® positif et un Filarassay® positif. Ces résultats sont en faveur d'une infestation par *Dirofilaria immitis* avec microfilarémie.
- Pour les six chiens qui présentent un Snap 4DX® positif et un Filarassay® négatif, il s'agit également d'une infestation par *Dirofilaria immitis* mais elle est soit amicrofilarémique, soit la microfilarémie est trop faible pour être détectée avec cette méthode par filtration (manque de sensibilité).
- Trois des chiens présentent un Snap 4DX® négatif et un Filarassay® positif : ces résultats sont en faveur d'une infestation par *Dirofilaria repens* (ou éventuellement par une espèce du genre *Acanthocheilonema*). L'intérêt de la qPCR est de confirmer qu'il s'agit bien de *Dirofilaria repens* voire de l'infirmier dans le cas où il s'agirait d'une autre espèce de filaire ou de *Dirofilaria immitis* avec un test Snap 4DX® faussement négatif.

2) Résultats de la PCR en temps réel

a) Expériences préliminaires

i. Mise en place à l'ENVT du protocole de PCR quantitative décrit par Latrofa et al. en 2012 avec les extraits d'ADN de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* provenant d'Italie

Les premières qPCR réalisées avaient pour but de tester le protocole avec les échantillons d'ADN extraits de filaires adultes de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* provenant de l'Université de Bari en Italie.

Comme cela a été décrit dans les études menées en Italie, les courbes de dissociation obtenues font apparaître deux pics à différentes températures de fusion T_m : un premier pic à 71,2°C pour l'extrait d'ADN de *Dirofilaria repens* et un deuxième à 76,7°C pour l'extrait d'ADN de *Dirofilaria immitis*.

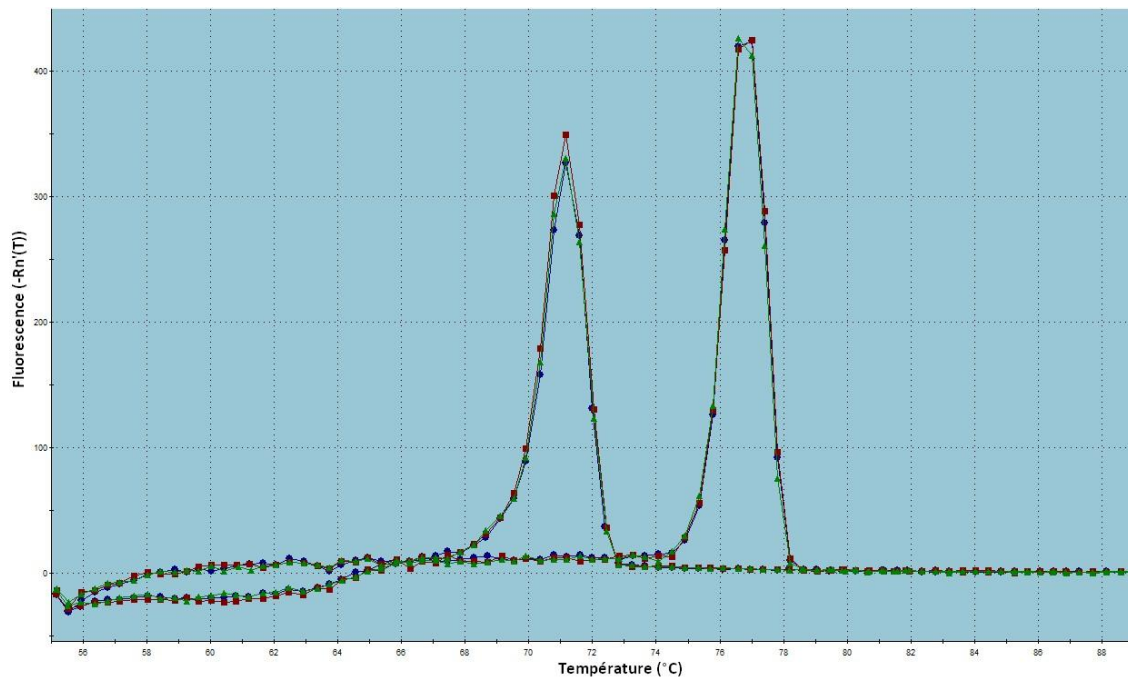


Figure 68 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extraits de filaires adultes des deux espèces : deux pics matérialisent des températures de fusion T_m différentes : un premier pic à 71,2°C pour l'extrait d'ADN de *Dirofilaria repens* et un deuxième à 76,7°C pour l'extrait d'ADN de *Dirofilaria immitis*.

	Température de fusion T_m	Ct		
Extrait d'ADN de <i>Dirofilaria immitis</i>	76,7°C +/- 0,1°C	14,72	14,76	15,20
Extrait d'ADN de <i>Dirofilaria repens</i>	71,2°C +/- 0,1°C	23,64	23,16	23,35

Tableau 16 : Récapitulatif des températures de fusion et des Ct obtenus pour les extraits d'ADN des 2 espèces de filaires provenant de l'Université de Bari en Italie (résultats en triplicata)

Aucun signal n'était obtenu pour les puits correspondant au témoin négatif, au témoin d'extraction Hex et à l'eau pour l'ensemble de nos manipulations, ce qui valide le bon déroulement de la qPCR. Ces extraits d'ADN peuvent servir de témoins positifs pour les qPCR réalisées en vue de détecter les microfilaires sanguines.

Néanmoins, la quantité d'ADN envoyée par l'Université de Bari en Italie était insuffisante pour servir de témoin positif pour l'intégralité des qPCR réalisées dans ce travail de thèse. Il a donc été nécessaire de trouver une autre source d'ADN de filaires pour servir de témoin positif.

ii. Nouveaux témoins positifs obtenus à partir de filaires adultes de Roumanie

Pour obtenir de nouveaux témoins positifs pour les réactions de qPCR, des filaires adultes provenant de la Faculté de médecine vétérinaire de Cluj-Napoca en Roumanie ont été transmises au Laboratoire de Parasitologie de l'ENVT. Une extraction d'ADN selon le protocole décrit en Annexe 4 a été réalisée et des qPCR ont été menées sur l'ADN extrait. Une dilution au 1/10^{ème} de l'ADN extrait a été nécessaire pour obtenir des résultats corrects.

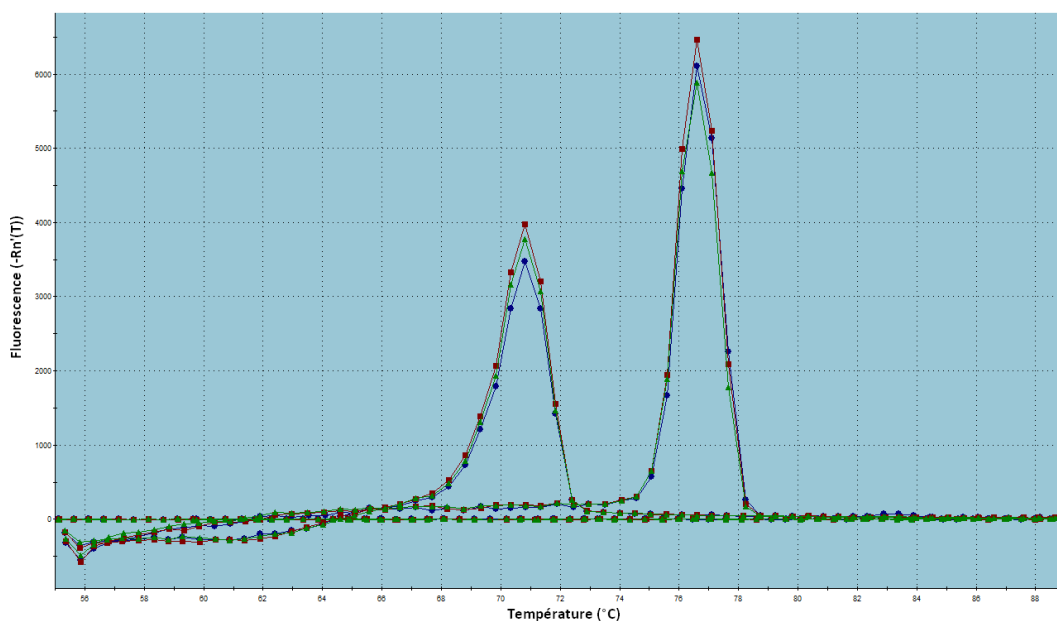


Figure 69 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extraits de filaires adultes de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* provenant de Cluj-Napoca en Roumanie.

	Température de fusion Tm	Ct		
Extrait d'ADN de <i>Dirofilaria immitis</i> dilué au 1/10 ^{ème}	76,6°C +/- 0,1°C	19,47	19,70	19,59
Extrait d'ADN de <i>Dirofilaria repens</i> dilué au 1/10 ^{ème}	70,9°C +/- 0,1°C	25,26	24,50	24,14

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des températures de fusion et des Ct obtenus pour les extraits d'ADN des 2 espèces de filaires provenant de l'Université de Cluj-Napoca en Roumanie (résultats en triplicata)

Les extraits d'ADN dilués au 1/10^{ème} des filaires issus de Roumanie serviront de témoins positifs pour les qPCR ayant pour but de rechercher les microfilaires dans le sang périphérique de chiens.

iii. Résultats des qPCR simplex sur les témoins positifs et séquençage des séquences amplifiées

Afin de tester la spécificité des couples d'amorces et d'exclure de possibles compétitions qui pourraient s'observer en PCR duplex (expliquant l'éventuelle absence d'amplification de la région *cox1* de *Dirofilaria repens* d'une part et du fragment d'ITS2 de *Dirofilaria immitis* d'autre part), des qPCR simplex ont été réalisées. Elles ont permis de confirmer cette spécificité puisque des amplicons ont été obtenus uniquement avec les amorces COI pour *Dirofilaria immitis* et ITS2 pour *Dirofilaria repens* (identifiés morphologiquement).

Tableau 18 : Tableau récapitulatif des résultats de Ct obtenus en qPCR simplex pour chaque couple d'amorces avec l'ADN de chacune des 2 espèces de filaires provenant de l'Université de Cluj-Napoca en Roumanie

Couples d'amorces	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dirofilaria repens</i>
COI (<i>cox1</i>)	Ct : 30.42 ; 31.15 ; 31.57	No Ct
ITS2 (ITS2)	No Ct	Ct : 24.64 ; 24.79 ; 23.62

Ces amplicons ont dans un second temps été purifiés et séquencés au GeT-Purpan. Les séquences obtenues ont été nettoyées et soumises à une analyse de leur spécificité *in silico* avec le logiciel BLASTn. Rappelons que la taille attendue était de 200 paires de bases pour la région *cox1* et de 300 paires de bases pour l'ITS2 (Latrofa et al. 2012). Néanmoins, la taille des séquences obtenues est plus courte que celle attendue du fait de problèmes de séquençage non résolus à l'issue de ce travail.

Avec le couple d'amorces COI s'hybridant sur la région *cox1*, seul l'extrait d'ADN de *Dirofilaria immitis* utilisé comme témoin positif a été amplifié et a donné une séquence partielle de *cox1* de 118 pb. Cette dernière est identique à 100% et avec 100 % de recouvrement aux 25 séquences *cox1* partielles déposées dans GenBank et après analyse avec BLASTn. Le couple d'amorces COI, qui n'a pas permis d'amplifier de séquence de *Dirofilaria repens*, est donc bien spécifique de *Dirofilaria immitis*.

Amplicon de 118 pb du *cox1* de *Dirofilaria immitis*

AGGTCTTCATACTGTTGGTATTGGTTCTTTATTAGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTGTTTCAGAATA
TACGTTCTACTGCTGTAACCTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTGTTGAACT

De même, pour les amorces ITS2, seul l'échantillon de *Dirofilaria repens* utilisé comme témoin positif a permis d'obtenir des amplicons avec une séquence de 187 pb identique à 100% à la séquence ITS2 de *Dirofilaria repens* suivant une analyse par BLASTn. Le couple d'amorces ITS2 est donc bien spécifique de *Dirofilaria repens*.

Amplicon de 187 pb de l'ITS2 de *Dirofilaria repens*

TATTATTTGTTGAAATAAATTCATCAGGTGATTTAAAATTTTATATGAAAAATTTACTATCCCCTGAT
TAAGTATTATATAAATAATATGTAAGTTTTTACTTACAATATTTTACATATTGAAATAAAAATAATTA
ATCTTTCGTAATATATTATATATTA

b) Résultats de la qPCR pour la recherche d'ADN des microfilaries sanguines sur les chiens prélevés dans l'étude

Pour chaque échantillon, la réaction de qPCR est menée à partir de l'extrait d'ADN pur et à partir de la dilution au 1/10^{ème} de cet extrait d'ADN.

i. Pour les chiens de France métropolitaine

- Pour les deux chiens provenant de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (31)

Aucun signal fluorescent n'a été mis en évidence initialement à partir de l'extrait d'ADN pur. Une seconde qPCR a été menée à partir de la dilution au 1/10^{ème} des extraits d'ADN et a révélé un résultat positif pour *Dirofilaria repens* chez ces deux chiens (avec des Ct de 28,97, 28,75 et 28,78 pour ENVT 1 et de 31,44, 31,10 et 31,80 pour ENVT 2). Les courbes de dissociation obtenues sont présentées dans les figures ci-dessous (les courbes des témoins positifs ont volontairement été retirées pour des raisons de lisibilité).

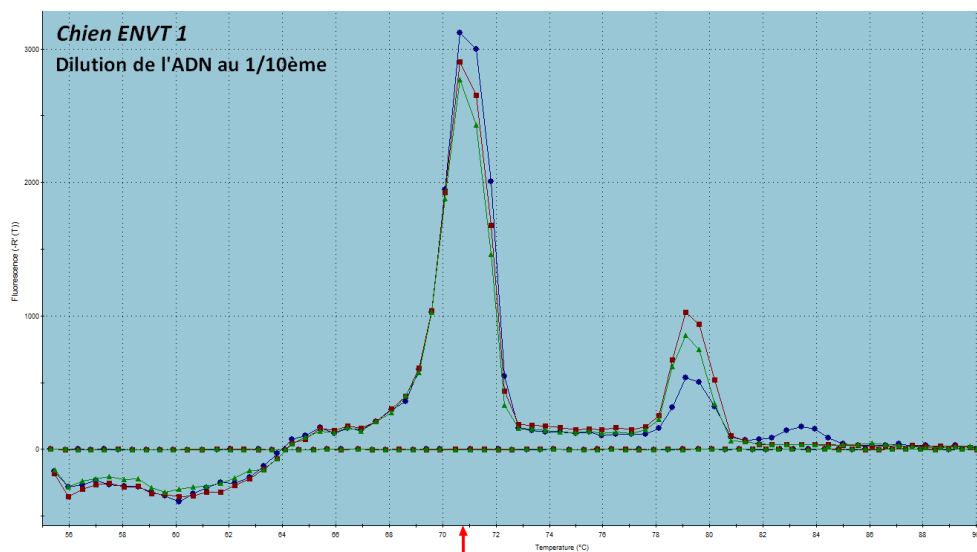


Figure 70 : Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien ENVT 1 après dilution au 1/10^{ème}, le pic à 70,7°C correspondant à l'espèce *Dirofilaria repens*

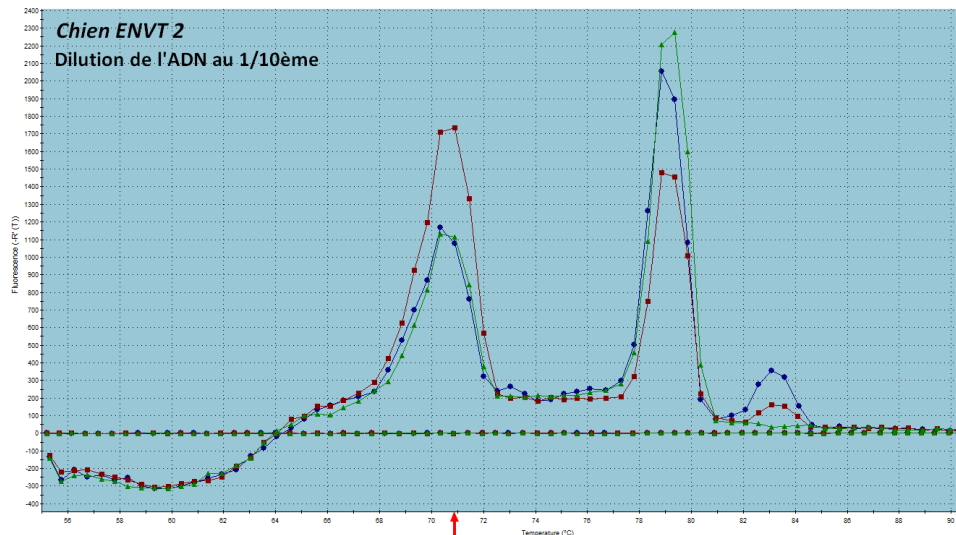


Figure 71 : Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien ENVT 2 après dilution au 1/10^{ème}, le pic à 70,7°C correspondant à l'espèce *Dirofilaria repens*.

Notons que chez ces deux chiens, on retrouve un pic à 79,1°C sur la courbe de dissociation, qui ne correspond à aucune des deux espèces de filaires recherchées. Pour ENVT 2, un pic de plus faible amplitude est également visualisable à 83,1°C.

- Pour les deux chiens provenant de la Clinique Vétérinaire du Vernet (31)

Pour le chien V1, la qPCR a permis de mettre en évidence l'ADN de *Dirofilaria repens* à partir de l'extrait d'ADN dilué au 1/10^{ème} avec des Ct de 33,32, 32,62 et 32,11; aucun signal fluorescent n'avait été mis en évidence initialement à partir de l'extrait d'ADN pur.

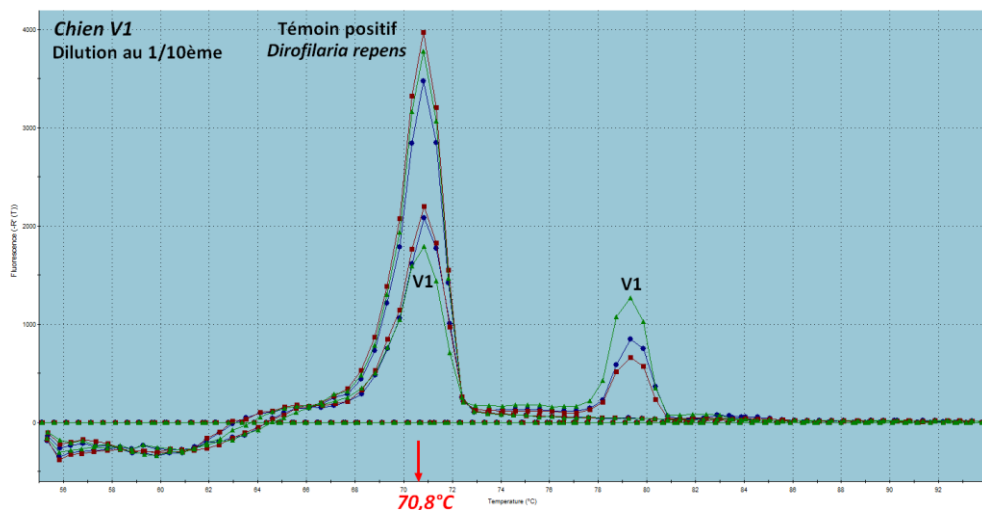


Figure 72 : Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien V1 de la clinique vétérinaire du Vernet (31) après dilution au 1/10^{ème}

Pour le chien V2, la qPCR s'est révélée négative pour les deux espèces de parasites. Pour l'extrait d'ADN dilué au 1/10^{ème}, un pic à 79,3°C est observable avec des Ct de 35,93, 35,40 et 35,56.

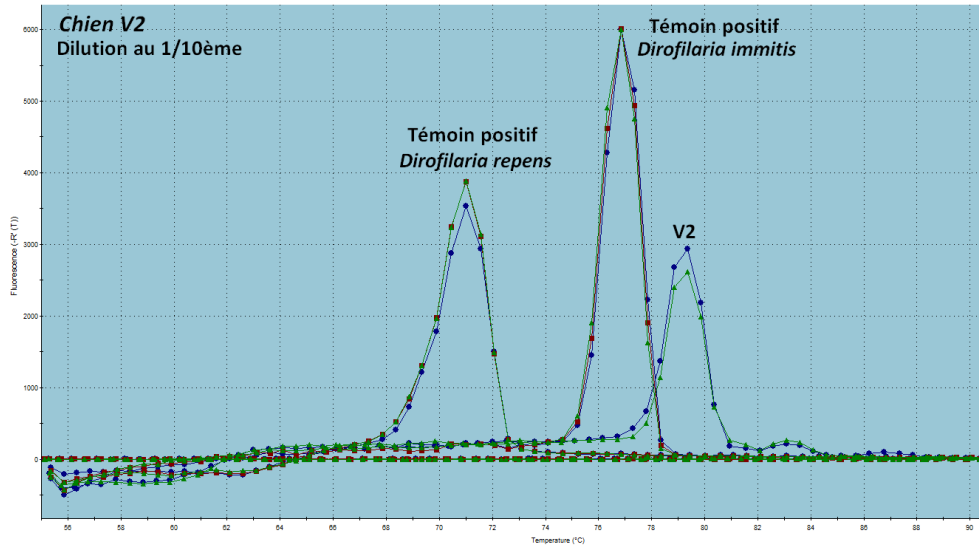


Figure 73: Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien V2 de la clinique vétérinaire du Vernet (31) après dilution au 1/10^{ème}

Un pic sur la courbe de dissociation à $T \approx 79,3^\circ\text{C}$ est également visualisable chez V1 et V2.

- Pour les 15 chiens du refuge de Flayosc dans le Var (83)

Toutes les qPCR se sont révélées négatives pour les deux parasites recherchés que ce soit avec l'extrait d'ADN pur ou avec la dilution au 1/10^{ème}. Pour plusieurs chiens, des pics surnuméraires sont observés à des températures qui ne correspondent au T_m d'aucun des deux parasites étudiés (par exemple à 79°C , à $83,6^\circ\text{C}$ et à $85,7^\circ\text{C}$). Les C_t associés étaient toujours > 37 .

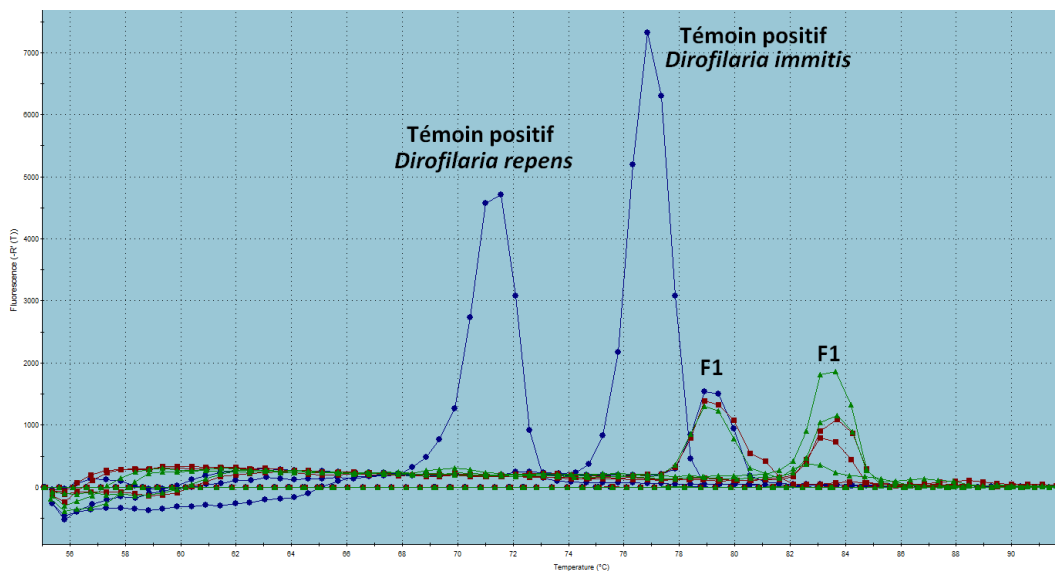


Figure 74 : Courbes de dissociation obtenues à partir de l'échantillon d'ADN extrait du sang du chien F1 du refuge de Flayosc (83) après dilution au 1/10^{ème}

ii. Pour les chiens des DOM-TOM

▪ Pour les 30 chiens provenant de La Réunion

Deux chiens présentent une qPCR positive pour la détection des microfilaires de *Dirofilaria immitis*. Pour le chien R10, la qPCR est positive avec l'extrait d'ADN pur (non dilué) avec des Ct de 22,04, 21,69 et 21,63 ainsi qu'après dilution au 1/10^{ème} avec des Ct de 26,19, 26,00 et 26,18. Pour le chien RL, la qPCR est également positive avec l'extrait d'ADN pur (non dilué) avec des Ct de 21,69, 23,92 et 22,00 ainsi qu'après dilution au 1/10^{ème} avec des Ct de 24,23, 24,02 et 23,91.

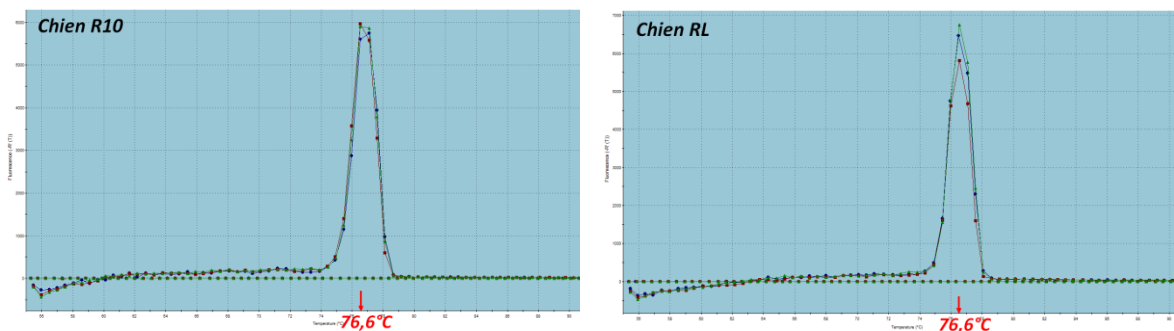


Figure 75 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extrait du sang des chiens R10 (à gauche) et RL (à droite) de La Réunion

▪ Pour les quatre chiens provenant de Guadeloupe

Trois des quatre chiens de Guadeloupe présentent une qPCR positive pour la détection des microfilaires de *Dirofilaria immitis* : pour G3 et G4, la qPCR s'est révélée positive avec l'extrait d'ADN pur (avec respectivement des Ct de 19,78, 19,94 et 19,42 et 22,55, 22,84 et 22,93) tandis qu'une dilution de l'ADN au 1/10^{ème} a été nécessaire pour obtenir un signal pour le chien G2 (Ct = 23,63, 23,49 et 23,57).

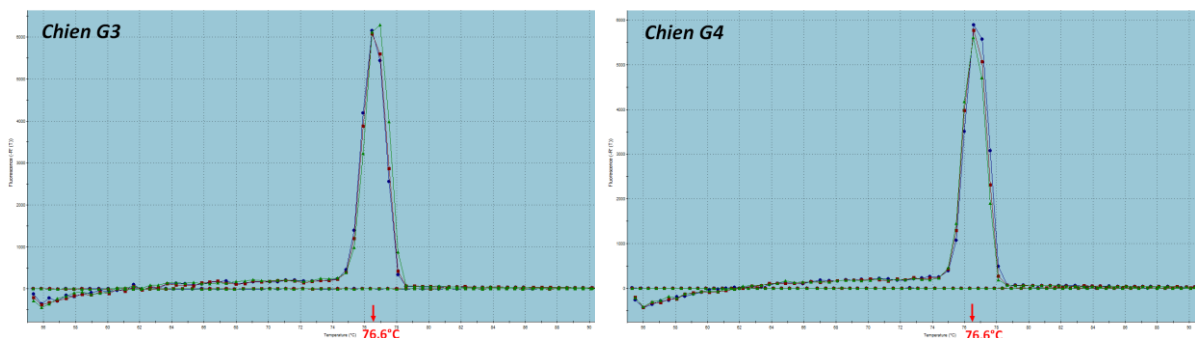


Figure 76 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extrait du sang des chiens G3 (à gauche) et G4 (à droite) de Guadeloupe

- Pour les 12 chiens de Nouvelle-Calédonie

Sept chiens ont une qPCR positive pour les microfilaries de *Dirofilaria immitis*. Pour six d'entre eux, la qPCR a permis la détection de l'ADN à partir de l'ADN extrait pur sans dilution ; un seul échantillon (NC11) a nécessité une dilution au 1/10^{ème} pour que le signal soit correct.

Tableau 19 : Nombres de cycle de qPCR (Ct) permettant aux sondes fluorescentes de dépasser le seuil de positivité pour les chiens de Nouvelle-Calédonie dont la qPCR est positive

Chien	Ct avec l'ADN extrait pur			Ct avec l'ADN extrait dilué au 1/10ème		
NC2	20,94	20,47	20,70	23,81	24,03	23,95
NC6	19,69	19,64	19,63	23,03	23,14	23,56
NC7	25,73	25,19	25,10	28,71	28,64	28,49
NC8	20,14	20,60	20,89	24,10	24,30	24,28
NC9	No Ct	22,26	23,70	21,17	20,51	20,47
NC11	No Ct	No Ct	No Ct	21,98	21,60	21,65
NC12	No Ct	23,67	22,45	20,97	20,81	20,51

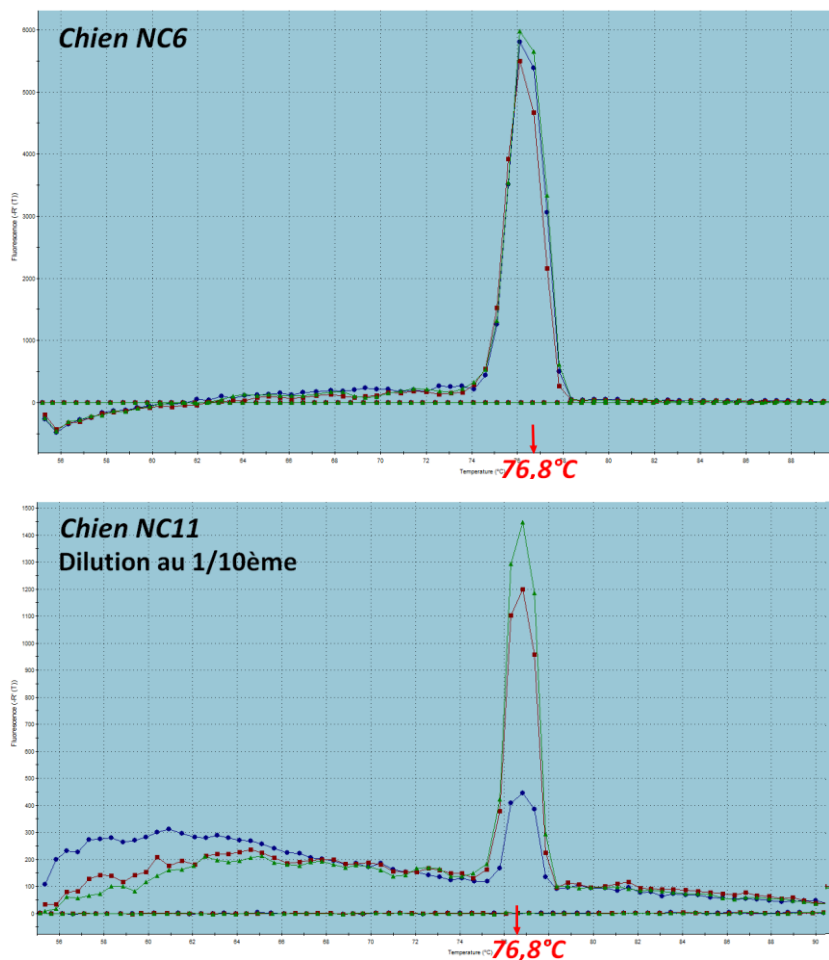


Figure 77 : Courbes de dissociation obtenues à partir des échantillons d'ADN extrait du sang des chiens C6 (à gauche) et NC11 dilué au 1/10ème (à droite) de Nouvelle-Calédonie

3) Synthèse des résultats

a) Pour les chiens de France métropolitaine

- Pour les deux chiens provenant de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse chez lesquels des microfilaries sanguines ont été visualisées au frottis sanguin et qui présentent un Snap 4DX® négatif (absence d'antigènes de *Dirofilaria immitis*), la qPCR a permis de confirmer une infestation par *Dirofilaria repens* à partir de la dilution au 1/10^{ème} de l'extrait d'ADN (aucun signal fluorescent n'avait été mis en évidence initialement à partir de l'extrait d'ADN pur).
- Pour le prélèvement du chien V1 envoyé par la Clinique Vétérinaire du Vernet (31) sur lequel des microfilaries avaient été visualisées au frottis sanguin, avec un Filarassay® positif, un test rapide Kitvia® négatif et un Snap 4DX® négatif pour la dirofilariose à *Dirofilaria immitis*, la qPCR a permis de mettre en évidence l'ADN de *Dirofilaria repens* à partir de l'extrait d'ADN dilué au 1/10^{ème} (aucun signal fluorescent n'avait été mis en évidence initialement à partir de l'extrait d'ADN pur).
- Pour le prélèvement du chien V2 envoyé par la Clinique Vétérinaire du Vernet (31) sur lequel il existait une suspicion clinique de dirofilariose cardiaque mais avec un Snap 4DX® négatif et l'absence de microfilaries sanguines, la qPCR s'est révélée négative pour les deux espèces de parasites.

Tableau 20 : Récapitulatif des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques sur les chiens provenant de l'ENVT et de la Clinique Vétérinaire du Vernet (31)

Chien	SNAP 4 DX®	Filarassay®	qPCR
ENVT1	Négatif	Positif	Positive pour <i>D. repens</i> (après dilution au 1/10e)
ENVT2	Négatif	Positif	Positive pour <i>D. repens</i> (après dilution au 1/10e)
V1	Négatif	Positif	Positive pour <i>D. repens</i> (après dilution au 1/10e)
V2	Négatif	Négatif	Négatif

- Pour les 15 échantillons de sang provenant des chiens issus du refuge de Flayosc qui présentaient tous des Snap 4DX® négatifs et des Filarassay® négatifs, toutes les qPCR se sont révélées négatives pour les deux parasites recherchés que ce soit avec l'extrait d'ADN pur ou avec dilution au 1/10^{ème}.

b) Pour les chiens des DOM-TOM

- Sur les 30 chiens provenant de La Réunion, cinq présentent un Snap 4DX® positif. Parmi ces derniers, deux présentent des microfilaires au test Filarassay® et une qPCR positive pour la détection des microfilaires de *Dirofilaria immitis*.

Notons que des anticorps dirigés contre *Ehrlichia canis* et/ou *Ehrlichia ewingii* ont été détectés chez 8 chiens dont 5 présentent également des antigènes de *Dirofilaria immitis* et un des anticorps d'*Anaplasma phagocytophilum*-*Anaplasma platys*.

Tableau 21 : Récapitulatif des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques sur les chiens provenant de la Réunion

Chiens	SNAP 4 DX®	Filarassay®	qPCR
R10	Positif <i>D. immitis</i> , Positif <i>Ehrlichia</i>	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>
R11	Positif <i>D. immitis</i> , Positif <i>Ehrlichia</i>	Négatif	Négative
R C	Positif <i>Ehrlichia</i>	Négatif	Négative
R E	Positif <i>Ehrlichia</i> et <i>Anaplasma</i>	Négatif	Négative
R G	Positif <i>D. immitis</i> , Positif <i>Ehrlichia</i>	Négatif	Négative
R H	Positif <i>Ehrlichia</i>	Négatif	Négative
R L	Positif <i>D. immitis</i> , Positif <i>Ehrlichia</i>	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>
R M	Positif <i>D. immitis</i> , Positif <i>Ehrlichia</i>	Négatif	Négative
Pour les 22 autres chiens	Négatif	Négatif	Négative

- Pour les 4 chiens de Guadeloupe, le Snap 4DX® est positif : trois d'entre eux présentent des microfilaires au test Filarassay® et une qPCR positive pour la détection des microfilaires de *Dirofilaria immitis* (une dilution de l'ADN extrait au 1/10^{ème} a été nécessaire pour obtenir un signal pour le chien G2). Le chien G1 est amicrofilarémique.

Tableau 22 : Récapitulatif des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques sur les chiens provenant de Guadeloupe

Chien	SNAP 4 DX®	Filarassay®	qPCR
G1	Positif	Négatif	Négative
G2	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i> (après dilution au 1/10e)
G3	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>
G4	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>

- Parmi les 12 chiens de Nouvelle-Calédonie, 8 présentent un Snap 4DX® positif. Parmi eux, 6 ont des microfilaires au test Filarassay® et 7 ont une qPCR positive pour les microfilaires de *Dirofilaria immitis*.

Tableau 23 : Récapitulatif des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques sur les chiens provenant de Nouvelle-Calédonie

Chien	SNAP 4 DX	Filarassay	qPCR
NC1	Négatif	Négatif	Négatif
NC2	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>
NC3	Négatif	Négatif	Négatif
NC4	Négatif	Négatif	Négatif
NC5	Positif	Négatif	Négatif
NC6	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>
NC7	Positif	Négatif	Positif pour <i>D. immitis</i>
NC8	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>
NC9	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>
NC10	Négatif	Négatif	Négatif
NC11	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i> (après dilution au 1/10e)
NC12	Positif	Positif	Positif pour <i>D. immitis</i>

c) **Tableau Bilan**

Tableau 24 : Tableau récapitulatif qui met en parallèle les résultats obtenus au test Filarassay® et au Snap 4DX® d'IDEXX avec ceux de la PCR quantitative. *Snap 4DX® positif pour *Dirofilaria immitis*

	qPCR positive		qPCR négative	Total
	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dirofilaria repens</i>		
Filarassay® positif Snap 4DX® positif*	11	0	0	11
Filarassay® positif Snap 4DX® négatif	0	3	0	3
Filarassay® négatif Snap 4DX® positif*	1	0	5	6
Filarassay® négatif ou NR Snap 4DX® négatif	0	0	45	45
Total	12	3	50	65

L'ensemble de ces résultats est repris et commenté dans la Partie IV) 5).

d) Étude statistique

- Évaluation de la qPCR comparée au Filarassay® pour détecter l'infestation par *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens*

Tableau 25 : Tableau croisé des résultats obtenus pour le test Filarassay® et la qPCR pour détecter une infestation par *Dirofilaria immitis* à partir de prélèvements sanguins de chiens. NB : Le nombre total d'échantillons est ici de 58 car le Filarassay® n'a pas pu être réalisé sur 7 prélèvements

		qPCR		
		Positive	Négative	
Filarassay®	Positif	14	0	14
	Négatif	1	43	44
		15	43	58

Tableau 26 : Sensibilité, Spécificité et coefficient Kappa de la qPCR en comparaison avec le test Filarassay® calculés à l'aide du logiciel DAG_Stat

		Intervalle de confiance à 95%	
		Limite inférieure	Limite supérieure
Sensibilité	100,00%	76,84%	NE
Spécificité	97,73%	87,98%	99,94%
Coefficient Kappa	0,95	0,86	1,04

Comparée aux résultats obtenus avec le test Filarassay®, la PCR quantitative présente une sensibilité de 100% : tous les chiens chez lesquels des microfilaries de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* ont été détectées au test Filarassay® ont une qPCR positive.

La spécificité est de 97,73% en comparaison du test Filarassay®.

Le coefficient Kappa est de 0,95. Cette valeur indique un excellent accord entre les deux tests.

- Évaluation de la qPCR comparée au Snap 4DX® pour détecter l'infestation par *Dirofilaria immitis*

Tableau 27 : Tableau croisé des résultats obtenus pour le test Snap 4DX® et la qPCR pour détecter une infestation par *Dirofilaria immitis* à partir de prélèvements sanguins de chiens

		qPCR		
		Positive	Négative	
Snap 4DX®	Positif	12	5	17
	Négatif	0	48	48
		12	53	65

Tableau 28 : Sensibilité, Spécificité et coefficient Kappa de la qPCR en comparaison avec le test Snap 4DX® calculés à l'aide du logiciel DAG_Stat

		Intervalle de confiance à 95%	
		Limite inférieure	Limite supérieure
Sensibilité	70,59%	44,04%	89,69%
Spécificité	100,00%	92,60%	NE
Coefficient Kappa	0,78	0,60	0,96

Comparée aux résultats obtenus avec le test Snap 4DX®, la PCR quantitative présente une sensibilité de 70,59%. Près de 30% des chiens avec un Snap 4DX® positif et donc présentant des antigènes circulants de *Dirofilaria immitis* n'ont pas été détectés par la réaction de qPCR qui amplifie l'ADN des microfilaries circulantes.

La spécificité de la qPCR est quant à elle de 100% : tous les chiens avec un Snap 4DX® négatif ont une qPCR négative.

Le coefficient Kappa est de 0,78. Cette valeur indique un bon accord entre les deux tests.

IV. Discussion

1) Population canine étudiée et prélèvements

a) Choix des chiens prélevés

- *Prélèvements sur des chiens susceptibles d'être infestés*

Les chiens sélectionnés pour intégrer notre étude sont choisis pour leur forte probabilité d'être infestés par *Dirofilaria immitis* ou par *Dirofilaria repens*. En effet, le but de ce travail est de mettre en place un protocole de PCR quantitative pour détecter et différencier les microfilaries de ces deux espèces qui sont les plus fréquentes en France. Il était donc nécessaire d'avoir des chiens potentiellement parasités pour attester de la validité de notre protocole et pour mettre en parallèle nos résultats avec ceux de deux autres tests diagnostiques (Filarassay® et Snap 4DX® IDEXX).

- *Médicalisation des chiens prélevés aléatoirement*

Pour les prélèvements réalisés au refuge de Flayosc, la médicalisation de certains chiens avec du MILBEMAX® ou du STRONGHOLD® est un paramètre qui n'était pas connu préalablement à la réalisation des prélèvements et qui diminue les chances de détection des microfilaries dans le sang de ces chiens. Les principes actifs de ces médicaments (respectivement la milbémycine oxime et la sélamectine) appartiennent à la famille des lactones macrocycliques et permettent la destruction des microfilaries sanguines.

- *Âge des chiens prélevés*

Pour les échantillons de la Réunion qui proviennent de chiens de refuge prélevés de manière aléatoire, un nombre non négligeable de chiens (n=11) ont moins d'un an : or le cycle de *Dirofilaria immitis* est long avec une période prépatente de 6 à 9 mois chez le chien. Ainsi, la probabilité de détecter des microfilaries sur un chien de moins d'1 an est plus faible que sur un chien adulte (mais ce n'est pas exclus dans le cas d'une infestation précoce du chiot).

b) Modalités du prélèvement

Le site de prélèvement (veine jugulaire, veine céphalique ou veine saphène externe) n'est pas imposé au vétérinaire réalisant la prise de sang.

De même, l'heure de prélèvement est laissée au libre choix du praticien : l'idéal aurait été de prélever les chiens en fin d'après midi ou en début de soirée puisqu'il existe un pic de microfilarémie dans la circulation superficielle au crépuscule pour *Dirofilaria immitis*

(Ledesma et Harrington, 2011). Il était néanmoins impossible en pratique d'imposer une plage horaire aux vétérinaires pour réaliser leurs prélèvements. Cette contrainte majeure aurait considérablement limité leur participation puisque la majorité de nos échantillons sont prélevés en consultation ou lors de visites dans les refuges et ce, à n'importe quel moment de la journée.

c) Conservation du sang total sur EDTA

Après le prélèvement, le tube de sang sur EDTA est conservé au réfrigérateur (4-8°C) ou au congélateur à -20°C.

Dans le cas d'un prélèvement réfrigéré, le délai de conservation avant réception de l'échantillon a été fixé arbitrairement à 7 jours : ce délai correspond au délai maximum de réalisation d'un Snap 4DX® IDEXX sur du sang total réfrigéré d'après la notice d'utilisation. Par conséquent, ce mode de conservation ne peut être envisagé que pour les échantillons qui peuvent être transmis au Laboratoire de Parasitologie de l'ENVT rapidement après la date de prélèvement : la réfrigération est donc envisageable pour les tubes de sang provenant de France métropolitaine mais pas pour ceux issus des DOM-TOM du fait du délai d'envoi pour regrouper les prélèvements et de la durée du transport.

L'autre possibilité qui s'impose pour les prélèvements réalisés dans les DOM-TOM est de conserver le tube de sang total sur EDTA au congélateur à -20°C. Il faut cependant être conscient de deux points : le premier est que l'interprétation du Filarassay® est plus difficile car les microfilaires sont inertes et leur mise en évidence peut être plus délicate lors de trop longue conservation. D'autre part, la réalisation du Snap 4DX® IDEXX ne répond alors pas aux indications de la notice d'utilisation. Il y figure que l'échantillon à tester peut être du plasma congelé ou du sang total réfrigéré de moins de 7 jours mais le sang total congelé n'est pas mentionné. Il était néanmoins impossible de procéder autrement dans le cadre de ce travail de thèse du fait du délai nécessaire à la collecte et au transport des prélèvements.

d) Transport des prélèvements

Les échantillons réfrigérés et congelés sont transmis par colis postaux en express et sont préalablement emballés dans des pains de glace pour optimiser la conservation. Néanmoins, la durée de transport de plusieurs jours (voire de plusieurs semaines) pour les prélèvements provenant des DOM-TOM fait qu'ils ont probablement été exposés à des températures bien supérieures à 4°C. En pratique, cela ne semble pas avoir eu d'impact majeur pour la réalisation des tests diagnostiques, notamment la qPCR.

2) Méthode de concentration pour détecter les microfilaires

a) Choix de la méthode

Comme cela est abordé dans la Partie 1 II. 1) a), il existe plusieurs moyens d'observer directement les microfilaires sanguines. Les méthodes qui donnent les meilleurs résultats avec une sensibilité comparable de 93,75% sont la méthode de Knott modifiée et la méthode par filtration sur membrane (Ducos de Lahitte. 1990). Elles reposent sur l'examen d'une quantité de sang (1mL) plus importante comparativement à un simple frottis sanguin, ce qui augmente la probabilité de détection du parasite.

Le choix s'est ici porté sur la méthode par filtration sur membrane avec le test Filarassay® pour des raisons de disponibilité.

b) Limites de la méthode

La reconnaissance des microfilaires peut être rendue plus délicate lors d'une longue durée de conservation et suite à la congélation. De plus, la sensibilité de la méthode n'est pas optimale pour des chiens avec une faible microfilarémie avec un risque de faux négatif chez ces animaux.

3) Test de détection des antigènes de *Dirofilaria immitis*

a) Choix du test rapide

Les tests rapides de détections des antigènes circulants de *Dirofilaria immitis* disponibles en médecine vétérinaire reposent sur la méthode ELISA ou sur l'immunochromatographie. Ils sont rapides à mettre en œuvre et fournissent un résultat en une dizaine de minutes avec une sensibilité et une spécificité très correctes (respectivement de 94% à 100% et de l'ordre des 100%).

Notre choix s'est porté sur le test Snap 4DX® des laboratoires IDEXX car il s'agit d'un test disponible à l'ENVV, performant (sensibilité de 99,2% et spécificité de 100%) et qui ne présente pas comme contre-indication l'utilisation de sang total congelé (même si la notice ne mentionne cependant pas qu'il est utilisable).

L'utilisation du Snap Dirofilariose® IDEXX aurait pu s'envisager et aurait permis une évaluation semi-quantitative de l'antigénémie (faible ou importante). Néanmoins, cela ne présentait pas de réel intérêt dans le cadre de notre étude dont l'objectif était de mettre en place une qPCR qui détecte les microfilaries sanguines puisqu'il n'existe pas de relation directe entre le nombre de microfilaries circulantes et le nombre de filaires adultes.

b) Limites de l'interprétation

Il se pose le problème de la congélation du sang total : il est mentionné dans la notice d'utilisation du test Snap 4DX® que seul peut être conservé le plasma congelé en vue de la réalisation d'un test. Rappelons qu'il était nécessaire de disposer du sang total pour réaliser la qPCR.

Il n'était de plus pas envisageable de demander aux vétérinaires participants à l'étude de réaliser le test rapide avant congélation du sang ou de leur exiger de congeler 2 tubes (1 avec du sang total et 1 avec du plasma après centrifugation). Nous avons donc décidé de réaliser quand même ces tests rapides sur le sang total après décongélation en étant conscient des limites de notre méthode.

La seule anomalie rencontrée lors de la réalisation de ces tests est un délai plus long pour la migration initiale du mélange sang + conjugué. L'activation du test Snap qui libère le liquide de rinçage n'était alors effectuée qu'après migration complète soit un délai d'une quinzaine de minutes au maximum. La validité des tests était validée par les témoins positifs et négatifs qui ont réagi correctement sur tous les Snap 4DX® réalisés.

4) PCR en temps réel

a) Choix des amorces

Les deux gènes utilisés, la sous unité 1 du gène du cytochrome C oxidase mitochondrial (cox1) d'une part et l'espace interne transcrit 2 (ITS2) de l'ADN ribosomal d'autre part sont des marqueurs génétiques classiquement utilisés pour l'identification des espèces de parasites (Gasser 1999, Latrofa et al. 2012). En effet, chez les filaires, ces régions présentent une faible variabilité intra-spécifique et une importante variabilité interspécifique, ce qui en fait d'excellents marqueurs spécifiques (Mishra et al. 2007).

De plus, la spécificité de ces amorces a été vérifiée au cours de ce travail : le couple d'amorces COI permet uniquement d'amplifier la séquence de cox1 de *Dirofilaria immitis* de même que le couple d'amorces ITS2 ne permet que d'amplifier la séquence ITS2 de *Dirofilaria repens*. Les séquences sont identiques à 100% avec 100% de recouvrement à celles déposées dans le GenBank après analyse avec BLASTn.

b) Choix des témoins positifs

Les publications scientifiques actuelles décrivant des méthodes de diagnostic moléculaire pour détecter les microfilaries sanguines utilisent classiquement l'ADN de fragments de filaires adultes comme témoins positifs (Latrofa et al. 2012 ; Albonico et al. 2013). Il en a été de même pour les qPCR menées dans ce travail de thèse : les témoins positifs étaient dans un premier temps des extraits d'ADN de filaires adultes directement envoyés par l'Université de Bari en Italie, puis des extraits d'ADN de filaires des deux espèces provenant de Roumanie dont l'extraction a été réalisée à l'ENVIT à partir de vers conservés dans l'éthanol. Ce mode de conservation est cependant discutable puisque l'éthanol est reconnu comme un inhibiteur des réactions de PCR (Schrader et al. 2012).

c) Sensibilité de la PCR en temps réel

i. Nécessité d'une dilution au 1/10^{ème} de l'extrait d'ADN

Lors de la réalisation des qPCR, des résultats négatifs ont été obtenus pour les extraits d'ADN purs issus de fragments de filaires de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* provenant de Roumanie. L'existence de faux négatifs a alors été envisagée. Une dilution au 1/10^{ème} des extraits d'ADN a été réalisée et a permis d'obtenir des qPCR positives pour chacune des deux

espèces. Il est en effet reconnu que la dilution d'un échantillon est un moyen rapide et simple qui permet d'obtenir une amplification dans de nombreuses situations d'inhibition de la réaction de PCR (Wilson. 1997).

De même, pour des échantillons sanguins de chiens inclus dans l'étude sur lesquels des microfilaires avaient été observées au test Filarassay®, certaines qPCR ont donné des résultats négatifs avec l'extrait d'ADN pur. Il a alors été envisagé qu'il s'agissait soit de faux négatifs, soit que l'espèce de microfilaires chez ces chiens n'était ni *Dirofilaria repens*, ni *Dirofilaria immitis*.

Une dilution au 1/10^{ème} a été réalisée et a permis d'obtenir des résultats cohérents avec le test Filarassay® : les chiens pour lesquels des microfilaires sanguines avaient été visualisées au microscope photonique ont tous présenté des qPCR positives pour l'une ou l'autre des espèces de filaire. Les qPCR ont donc été réalisées à partir de l'extrait d'ADN pur et de l'extrait d'ADN dilué au 1/10^{ème} pour chacun des échantillons sanguins des chiens inclus dans l'étude.

Ainsi, la dilution permet de réduire la concentration en inhibiteurs (Wilson. 1997). Pour expliquer l'inhibition de la réaction de PCR, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

- La quantité totale d'ADN impacte le bon déroulement de la réaction de qPCR. L'ADN est en effet considéré comme un inhibiteur de la PCR au même titre qu'un sel. Une quantité trop importante d'ADN de microfilaires dans l'échantillon peut inhiber l'amplification d'une part en complexant les ions magnésium qui ne sont de fait plus disponible pour l'ADN polymérase (d'où une baisse de son activité) et d'autre part en causant un encombrement stérique qui perturbe le fonctionnement de l'ADN polymérase et qui gêne l'hybridation des amorces (Altshuler. 2006).
- Des inhibiteurs peuvent intervenir dans la réaction et provenir en particulier de l'étape d'extraction de l'ADN qui fait intervenir des sels chaotropes dans ses solutions tampons. Ces substances, nécessaires à la lyse cellulaire et à la dénaturation protéique sont reconnues comme étant des inhibiteurs de la PCR (Schrader et al. 2012). Néanmoins, elles sont normalement éliminées au fur et à mesure des étapes de l'extraction d'ADN lors des rinçages. De plus, pour les échantillons d'ADN extraits des filaires adultes, le mode de conservation de ces filaires dans l'éthanol n'est pas optimal en vue de la réalisation de PCR, l'éthanol étant reconnu comme étant un inhibiteur de la PCR.

Notons que pour *Dirofilaria repens*, la dilution au 1/10^{ème} a toujours été nécessaire pour que la qPCR permette la détection des microfilaries de ce parasite (absence de signal avec l'ADN extrait pur) tandis que cette dilution n'a été nécessaire que pour 2 chiens sur 12 pour la détection des microfilaries de *Dirofilaria immitis*.

ii. Sensibilité de la qPCR par rapport au test Filarassay®

Tous les chiens présentant des microfilaries au test Filarassay® ont présenté une qPCR positive pour l'une ou l'autre des espèces de microfilaries : comparée aux résultats obtenus avec le test Filarassay®, la PCR quantitative présente une sensibilité de 100%. Le coefficient Kappa entre le Filarassay® et la qPCR pour la détection des microfilaries de *Dirofilaria immitis* est de 0,95 et indique un excellent accord entre ces deux tests.

Un des 65 chiens de l'étude a présenté une qPCR positive pour les microfilaries de *Dirofilaria immitis* et un test Filarassay® négatif. Ce résultat semble aller dans le sens que la PCR quantitative est une méthode plus sensible que la méthode par filtration pour la détection des microfilaries sanguines. Il est néanmoins impossible de tirer des conclusions du fait du nombre insuffisant d'échantillons.

iii. Sensibilité de la qPCR par rapport au Snap 4DX®

Comparée aux résultats obtenus avec le test Snap 4DX®, la PCR quantitative présente une sensibilité de 70,59% pour la détection de l'infestation par *Dirofilaria immitis*. Près de 30% des chiens avec un Snap 4DX® positif et donc présentant des antigènes circulants de *Dirofilaria immitis* n'ont pas été détectés par la réaction de qPCR qui amplifie l'ADN des microfilaries circulantes. Cela s'explique par le fait que ces animaux avec une qPCR négatives sont amicrofilarémiques malgré la présence de filaires femelles adultes dans leurs artères pulmonaires.

Le coefficient Kappa est de 0,78. Cette valeur indique un bon accord entre les deux tests.

d) Spécificité de la PCR en temps réel

i. Amplifications non spécifiques

Sur les courbes de dissociation des qPCR de certains chiens, notamment ceux de Flayosc, du Vernet ou de Nouvelle-Calédonie, des pics surnuméraires sont présents à des températures qui ne correspondent pas aux températures de fusion des deux espèces de filaires. Ces éléments attestent de l'importance de l'évaluation des T_m sur la courbe de dissociation pour distinguer ces hybridations aspécifiques de l'amplicon d'intérêt.

La présence de ces pics s'explique par des hybridations non spécifiques des amorces. Il ne peut pas s'agir ici de dimères d'amorces car la température de fusion de ces amplicons aspécifiques est supérieure à la température de fusion des amplicons d'intérêt. Pour évaluer la taille et la séquence de ces amplicons correspondant à des pics surnuméraires et rechercher d'éventuelles correspondances avec des séquences connues, de nouvelles PCR quantitatives ont été menées. Les amplicons obtenus ont été purifiés au Laboratoire de Parasitologie de l'ENVT et ont par la suite été transmis au plateau de génome et transcriptome GeT-Purpan où ils ont été séquencés. Les séquences obtenues étaient malheureusement de trop mauvaise qualité et le séquençage n'a pas abouti à des résultats interprétables.

ii. Spécificité de la qPCR comparée aux autres tests

La spécificité de la qPCR est de 97,73% en comparaison du test Filarassay® qui est considéré dans notre analyse statistique comme le test de référence à partir duquel les résultats de la qPCR sont comparés. Cette valeur peut néanmoins s'expliquer par une meilleure sensibilité de la PCR en temps réel qui est capable de détecter la présence de microfilaires qui n'auraient pas été détectées au test Filarassay®.

La spécificité de la qPCR comparée au Snap 4DX® est de 100% : tous les chiens avec un Snap 4DX® négatif ont une qPCR négative.

5) Interprétation des résultats

Les Tableaux 28 et 29 récapitulent le nombre de chiens infestés dans chaque zone géographique incluse dans l'étude (France métropolitaine, La Réunion, Guadeloupe, Nouvelle-Calédonie) ainsi que les résultats des différents tests diagnostiques pour ces chiens.

Tableau 29 : Nombre de chiens inclus dans l'étude qui sont infestés par *Dirofilaria immitis* ou par *Dirofilaria repens* en France métropolitaine et dans les DOM-TOM

	Nombre de chiens infestés par <i>Dirofilaria immitis</i>	Nombre de chiens infestés par <i>Dirofilaria repens</i>	Nombre total de chiens
France métropolitaine	0	3	19
La Réunion	5 dont 3 amicrofilarémiques	0	30
Guadeloupe	4 dont 1 amicrofilarémique	0	4
Nouvelle Calédonie	8 dont 1 amicrofilarémique	0	12
Total	17 dont 5 amicrofilarémiques	3	65

Tableau 30 : Résultats obtenus avec le test Filarassay®, le Snap 4DX® et la PCR quantitative sur les chiens inclus dans l'étude et provenant de France métropolitaine et des DOM-TOM

	Nombre de chiens infestés par <i>Dirofilaria immitis</i>			Nombre de chiens infestés par <i>Dirofilaria repens</i>		Nombre total de chiens testés
	Snap 4DX® positif	Filarassay® positif	qPCR positive	Filarassay® positif	qPCR positive	
France métropolitaine	0	0	0	3	3	19
La Réunion	5	2	2	0	0	30
Guadeloupe	4	3	3	0	0	4
Nouvelle Calédonie	8	6	7	0	0	12
Total	17	11	12	3	3	65

- Tous les chiens de l'étude infestés par *Dirofilaria repens* (n=3) proviennent de France métropolitaine. De même, aucun chien de France métropolitaine ne s'est révélé infesté par *Dirofilaria immitis*. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques qui rapportent une prévalence supérieure de *Dirofilaria repens* par rapport à celle de *Dirofilaria immitis* (Ducos de Lahitte. 1990).
- Les taux d'infestation par *Dirofilaria immitis* des chiens inclus dans l'étude étaient de 16,7% pour les chiens provenant de la Réunion, de 100% pour ceux provenant de

Guadeloupe et de 66,7% pour ceux provenant de Nouvelle-Calédonie. Il n'est néanmoins pas possible d'évaluer des prévalences ou de tirer des conclusions à partir de ces résultats puisque les chiens ont été choisis pour leur forte probabilité d'être infesté et certains échantillons ont été envoyés suite à un diagnostic déjà établi par le vétérinaire sur place.

- Sur les 17 chiens sur lesquels des antigènes de filaires adultes de *Dirofilaria immitis* ont été détectés à partir du Snap 4DX®, 12 présentent des microfilaries sanguines détectables à la qPCR. Parmi ces 12 chiens, le test Filarassay® a révélé des microfilaries sur 11 d'entre eux.
- Notons que tous les chiens chez lesquels des microfilaries sanguines ont été détectées présentent un Snap 4DX® positif, ce qui valide l'excellente sensibilité de cette méthode de détection des antigènes.
- Ainsi, cinq chiens dont trois de la Réunion, un de Guadeloupe et un de Nouvelle-Calédonie présentent des antigènes de filaires adultes de *Dirofilaria immitis* (Snap 4DX® positif) en l'absence de microfilaries sanguines (test Filarassay® et qPCR négatifs).
Il s'agit de formes amicrofilarémiques qui peuvent correspondre à des infestations en période pré-patente d'une primo-infestation (c'est à dire dans les 6 à 7 mois qui suivent l'infestation), à des infestations unisexes (par des vers femelles car ce sont leurs antigènes qui sont détectés au test Snap 4DX®), à des formes dans lesquelles le système immunitaire détruit rapidement les microfilaries ou à des chiens ayant reçu un traitement avec de la doxycycline ou des lactones macrocycliques.
 - Pour le chien provenant de Guadeloupe, aucune information n'est disponible.
 - Le chien de Nouvelle-Calédonie est un chien errant mâle croisé d'environ 5 ans qui ne présente aucun symptôme de la maladie. Aucune information n'est disponible sur ses antécédents de traitements. Aucune des hypothèses n'est donc privilégiée chez cet animal.
 - Les trois chiens de la Réunion ne présentant pas de microfilaries sanguines sont âgés de 6 mois, 1,5 an et 5 ans et sont tous les 3 des femelles. Il s'agit de 3 chiennes errantes asymptomatiques chez lesquelles les traitements antérieurs ne sont pas connus. Pour la chienne de 6 mois, l'hypothèse la plus probable est que l'infestation est amicrofilarémique car les vers sont immatures et ne produisent pas encore de microfilaries (période pré-patente). Pour les deux autres, aucune hypothèse n'est privilégiée.

- Dans notre étude, le pourcentage d'infestations amicrofilarémiques par *Dirofilaria immitis* est de 29%. Ce résultat est en accord avec les données bibliographiques qui estiment que 20 à 30% des infestations sont amicrofilarémiques (Schrey et Trautvetter. 1998).

Conclusion

Dirofilaria immitis et *Dirofilaria repens* sont les deux principales espèces de filaires impliquées dans les infestations canines et zoonotiques en Europe.

Le chien joue le rôle d'hôte définitif et de réservoir pour ces parasites. Les filaires adultes de ces deux espèces produisent des microfilaires qui sont libérées dans la circulation sanguine. Les hôtes intermédiaires appartiennent de la famille des Culicidés : ils s'infestent en ingérant des microfilaires au cours d'un repas sanguin et peuvent ensuite transmettre des larves à d'autres chiens (ou à des hommes) lors des prochains repas de sang. Le cycle évolutif de ces filaires dure entre 6 et 9 mois.

Les vers adultes de *Dirofilaria immitis* sont localisés dans les artères pulmonaires et le cœur droit et sont responsables du développement d'une hypertension pulmonaire et d'une insuffisance cardiaque droite chez le chien. L'expression clinique de la dirofilariose cardio-pulmonaire est polymorphe et les symptômes observés dépendent de la charge parasitaire. Le pronostic vital de l'animal est engagé et de graves complications peuvent survenir : Syndrome de la Veine Cave, coagulation intravasculaire disséminée, thrombo-embolie pulmonaire...

Dirofilaria repens est peu pathogène chez le chien : les vers adultes sont présents dans le tissu sous-cutané et l'infestation est le plus souvent asymptomatique. Les signes cliniques observés sont des troubles dermatologiques et peuvent être liés aux formes adultes avec des dermatoses nodulaires ou aux microfilaires qui entraînent des lésions prurigineuses et érythémateuses.

Ces deux espèces de filaires ont un potentiel zoonotique, en particulier *Dirofilaria repens* qui est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infestations humaines en Europe. Il est donc primordial de dépister ces parasitoses et de les traiter afin d'éviter que les chiens infestés ne servent de réservoir à l'infestation humaine.

Le diagnostic des dirofilarioses passe par la détection des antigènes solubles de *Dirofilaria immitis* grâce à des tests sérologiques rapides d'une part et par l'observation directe des microfilaires d'autre part. Néanmoins, la différenciation des microfilaires de ces deux espèces est difficile et nécessite des colorations histochimiques, longues et difficiles à réaliser, d'où l'intérêt de la mise en place d'une méthode de détection moléculaire.

La partie expérimentale de ce travail de thèse s'est appuyée sur des études menées en 2012 par Latrofa et al. en Italie et a permis de développer une PCR quantitative duplex qui détecte simultanément les microfilaires de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* et permet de les différencier à partir d'un prélèvement de sang périphérique.

Au total, 65 chiens susceptibles d'être infestés par une de ces deux espèces et provenant de France métropolitaine et des DOM-TOM ont été recrutés. Trois chiens résidant en Haute Garonne (31) ont été retrouvés infestés par *Dirofilaria repens*. Dix sept chiens issus des DOM-TOM (La Réunion : n=5, Guadeloupe : n=4, Nouvelle Calédonie : n=8) se sont révélés infestés par *Dirofilaria immitis* et douze d'entre eux ont présenté une microfilarémie détectable avec la qPCR. Le taux d'infestation amicrofilarémique était de 29% sur cet échantillon.

L'intérêt et les limites des différentes méthodes de dépistage sont discutés dans ce travail qui souligne néanmoins que les méthodes de diagnostic moléculaire offrent aujourd'hui de nouvelles perspectives en matière de détection et d'identification spécifique des filarioses canines.

Bibliographie

ABRAHAM D et GRIEVE RB (1990). Genetic control of murine immune responses to larval *Dirofilaria immitis*. *The Journal of parasitology*. Vol. 76, n° 4, pp. 523-528.

ALBONICO F, LOIACONO M, GIOIA G, GENCHI C, GENCHI M et MORTARINO M (2014). Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. *Veterinary Parasitology*. Vol. 200, n° 1-2, pp. 128-132.

ALTSHULER ML (2006). *PCR Troubleshooting: The Essential Guide*. Caister Academic Press.

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY (2014). Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs.

ANDERSON RC (2000). Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2^{ème} édition. Wallingford.

AROCH I, ROJAS A, SLON P, LAVY E, SEGEV G et BANETH G (2015). Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Veterinary Parasitology*. Vol. 211, n° 3-4, pp. 303-305.

ATKINS CE (2003). Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 222, n° 9, pp. 1221-1223.

ATWELL R, TARISH JH, SOLL MD, KNIGHT DH (1995). The effect of oral, low-dose prednisolone on the extent of pulmonary pathology associated with dead *Dirofilaria immitis* in a canine lung model. In : *Proceedings of the heartworm symposium '95, Auburn, Alabama, USA*, American Heartworm Society. pp. 103-111.

AUGUST JR (2010). *Consultations in Feline Internal Medicine*. Philadelphia : Elsevier Saunders.

BANETH G, THAMSBORG SM, OTRANTO D, GUILLOT J, BLAGA R, DEPLAZES PP et SOLANO-GALLEGO LL (2015). Major Parasitic Zoonoses Associated with Dogs and Cats in Europe. *Journal of Comparative Pathology*. pp. 1-21.

BANETH G, VOLANSKY Z, ANUG Y, FAVIA G, BAIN O, GOLDSTEIN RE et HARRUS S (2002). *Dirofilaria repens* infection in a dog : diagnosis and treatment with melarsomine and doramectin. *Veterinary Parasitology*. Vol. 105, n° 2, pp. 173-178.

BARR SC, BOWMAN DD, PEREGRINE AS (2007). The 5-minute Veterinary Consult Clinical Companion — Canine and Feline Infectious Diseases and Parasitology. *The Canadian Veterinary Journal*. Vol. 48, n° 4, pp. 388.

BAZZOCCHI C, GENCHI C, PALTRINIERI S, LECCHI C, MORTARINO M et BANDI C (2003). Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the Wolbachia surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8. *Veterinary Parasitology*. Vol. 117, n° 1-2, pp. 73-83.

BAZZOCCHI C, MORTARINO M, GRANDI G, KRAMER LH, GENCHI C, BANDI C, GENCHI M, SACCHI L et MCCALL JW (2008). Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *International Journal for Parasitology*. Vol. 38, n° 12, pp. 1401-1410.

- BLAGBURN BL, ARTHUR RG, DILLON AR, BUTLER JM, BOWLES JV, VON SIMSON C et ZOLYNAS R (2016). Efficacy of four commercially available heartworm preventive products against the JYD-34 laboratory strain of *Dirofilaria immitis*. *Parasites & Vectors*. Vol. 9, pp. 191.
- BOCKOVÁ E, IGLÓDYOVÁ A et KOČIŠOVÁ A, (2015). Potential mosquito (Diptera:Culicidae) vector of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in urban areas of Eastern Slovakia. *Parasitology Research*. Vol. 114, n° 12, pp. 4487-4492.
- BOLIO ME, MONTES AM et GUTIERREZ C (2002). Hallazgos clínicos en perros parasitados por *Dipetalonema dracunculoides*. Clinical findings in dogs parasited by *Dipetalonema dracunculoides*. *Arch. Med. Vet*. Vol. XXXIV, n° 2, pp. 283-286.
- BOUDREAUX MK, DILLON AR, RAVIS WR, SARTIN EA et SPANO JS (1991). Effects of treatment with aspirin or aspirin/dipyridamole combination in heartworm-negative, heartworm-infected, and embolized heartworm-infected dogs. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 52, n° 12, pp. 1992-1999.
- BOURDOISEAU G (2000). *Parasitologie clinique du chien*. NEVA.
- BOURGUINAT C, KELLER K, PRICHARD RK et GEARY TG (2011). Genetic polymorphism in *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*. Vol. 176, n° 4, pp. 368-373.
- BOURGUINAT C, LEE AC, LIZUNDIA R, BLAGBURN BL, LIOTTA JL, KRAUS M, KELLER K, EPE C, LETOURNEAU L, KLEINMAN CL, PATERSON T, GOMEZ EC, MONTOYA-ALONSO J et SMITH H (2015). Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Veterinary Parasitology*. Vol. 210, n° 3-4, pp. 167-178.
- BOWMAN DD et ATKINS CE, 2009. Heartworm Biology, Treatment, and Control. *Vet Clin Small Anim*. (2009). Vol. 39, pp. 1127–1158.
- BOWMAN DD et JOHNSON RC (1992). Effects of long-term administration of ivermectin and milbemycin oxime on circulating microfilariae and parasite antigenemia in dogs with patent heartworm infections. *Proceedings of the Heartworm Symposium*. pp. 151–8.
- BOWMAN DD et MANNELLA C (2011). Macrocyclic lactones and *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Topics in Companion Animal Medicine*. Vol. 26, n° 4, pp. 160-172.
- BOWMAN DD (2012). Heartworms, macrocyclic lactones, and the specter of resistance to prevention in the United States. *Parasites & Vectors*. Vol. 5, pp. 138.
- BRENER B, MILLAR PR, MATTOS DP, UCHÔA F, BASTOS B, LYRIO IR, ARAGON PL et SUDRÉ AP (2012). Ectopic dirofilariosis in two dogs from Rio de Janeiro state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Vol. 54, n° 3, pp. 175-177.
- BRIANTI E, OTRANTO D, DANTAS-TORRES F, WEIGL S, LATROFA MS, GAGLIO G, NAPOLI E, BRUCATO G, CAUQUIL L, GIANNETTO S et BAIN O (2012). *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. *Veterinary Parasitology*. Vol. 183, n° 3-4, pp. 330-337.
- CALVERT CA et LOSONSKY JM (1985). Pneumonitis associated with occult heartworm disease in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 186, n° 10, pp. 1097-1098.
- CARRETÓN E, MORCHÓN R, SIMÓN F, JUSTE MC, GONZÁLEZ-MIGUEL J et MONTOYA-ALONSO JA (2014). Evaluation of cardiopulmonary biomarkers during classic adulticide treatment versus the American Heartworm Society recommended treatment protocol in dogs infected by *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*. Vol. 206, n° 1–2, pp. 55-59.

CARRETÓN E, MORCHÓN R, SIMÓN F, JUSTE MC, MÉNDEZ JC et MONTOYA-ALONSO, JA (2014). Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in the assessment of the severity of canine dirofilariosis. *Veterinary Parasitology*. Vol. 206, n° 1-2, pp. 43-47.

CASTRIC C (2002). *Mise au point sur le diagnostic et le traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire et de l'angiostrongylose canines*. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

CHAUVE CM (1990). *Dirofilaria repens* (Railliet et Henry, 1911), *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1890), *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) et *Dipetalonema grassii* (Noé, 1907): quatre filaires méconnues du chien. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. N° 25, pp. 293-304.

COLES L, NORTH C et VANVEEN T (1988). Adult *Dirofilaria immitis* in hind leg abscesses of a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 24, n° 3, pp. 363-365.

COMANDATORE F, CORDAUX R, BANDI C, BLAXTER M, DARBY A, MAKEPEACE B, MONTAGNA M et SASSERA D (2015). Supergroup C Wolbachia, mutualist symbionts of filarial nematodes, have a distinct genome structure. *Open Biology*. Vol. 5, n° 12.

CORTES CE, CARDOSO L, GIANNELLI A, LATROFA MS, DANTAS-TORRES F et OTRANTO D (2014). Diversity of *Cercopithifilaria* species in dogs from Portugal. *Parasites & Vectors*. Vol. 7, pp. 261.

COURTNEY CH et ZENG Q (2001). Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens. *Veterinary Parasitology*. Vol. 96, n° 4, pp. 317-322.

CURTIS C (2015). Canine heartworm – an ever-present threat. *Veterinary Nursing Journal*. Vol. 30, n° 12, pp. 345-350.

DANTAS-TORRES F, LIA RP, BARBUTO M, CASIRAGHI M, CROVACE A, CALIGIANI L, GENCHI C et OTRANTO D (2009). Ocular dirofilariosis by *Dirofilaria immitis* in a dog: first case report from Europe. *The Journal of Small Animal Practice*. Vol. 50, n° 12, pp. 667-669.

DEMIASZKIEWICZ A, POLAŃCZYK G, OSIŃSKA B, PYZIEL A, KULIGOWSKA I, LACHOWICZ J et SIKORSKI A (2014). The prevalence and distribution of *Dirofilaria repens* in dogs in the Mazovian Province of Central-Eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. Vol. 21, n° 4, pp. 701-704.

DI CESARE A, BRAUN G, DI GIULIO E, PAOLETTI B, AQUILINO V, BARTOLINI R, LA TORRE F, MELONI S, DRAKE J et PANDOLFI F (2014). Field clinical study evaluating the efficacy and safety of an oral formulation containing milbemycin oxime/praziquantel (Milbemax®, Novartis Animal Health) in the chemoprevention of the zoonotic canine infection by *Dirofilaria repens*. *Parasit Vectors*. Vol. 7, pp. 347.

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

DIMRI U, SINGH SK, SHARMA MC, BEHER, SK, KUMAR D et TIWARI P (2012). Oxidant/antioxidant balance, minerals status and apoptosis in peripheral blood of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Research in Veterinary Science*. Vol. 93, n° 1, pp. 296-299.

DRAKE J, GRUNTMEIR J, MERRITT H, ALLEN L et LITTLE SE (2015). False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. *Parasites & Vectors*. Vol. 8, pp. 68.

- DUCOS DE LAHITTE J (1990a). Diagnostic des filarioses au laboratoire. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 1990. Vol. Numéro spécial Dirofilariose canine, n° 25, pp. 349-356.
- DUCOS DE LAHITTE J (1990b). Epidémiologie des filarioses en France. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. Vol. Numéro spécial Dirofilariose canine, n° 25, pp. 305-3010.
- DZIMIANSKI MT, MCCALL JW et MANSOUR AM (2010). The effect of prednisone on the efficacy of melarsomine dihydrochloride against adult *Dirofilaria immitis* in experimentally infected beagles. *In State of the Heartworm '10 Symposium*. Memphis.
- EGYED Z, SRÉTER T, SZÉLL Z, BESZTERI B, ORAVECZ O, MÁRIALIGETI K et VARGA I (2001). Morphologic and genetic characterization of *Onchocerca lupi* infecting dogs. *Veterinary Parasitology*. Vol. 102, n° 4, pp. 309-319.
- ESCCAP, (2012). *Control of vector-borne diseases in dogs and cats*.
- EUZEBY J (1990). *Dirofilaria immitis*. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. Vol. Numéro spécial Dirofilariose canine, n° 25, pp. 283-291.
- EUZEBY J (2008). *Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire*. Lavoisier.
- FERRI E, BAIN O, BARBUTO M, MARTIN C, LO N, UNI S, LANDMANN F, BACCEI SG, GUERRERO R, SOUZA LIMA S, BANDI C, WANJI S, DIAGNE M et CASIRAGHI M (2011). New insights into the evolution of *Wolbachia* infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PLoS One*. Vol. 6, n° 6.
- FOISSAC M, MILLION M, MARY C, DALES JP, SOURAUD JB, PIARROUX R et PAROLA P, (2013). Subcutaneous Infection with *Dirofilaria immitis* Nematode in Human, France. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 19, n° 1, pp. 171-172.
- GABRIELLI S, GIANNELLI A, BRIANTI E, DANTAS-TORRES F, BUFALINI M, FRAULO M, LA TORRE F, RAMOS R, CANTACESSI C, LATROFA MS, CANCRINI G et OTRANTO D (2014). Chronic polyarthritis associated to *Cercopithifilaria baina* infection in a dog. *Veterinary Parasitology*. Vol. 205, n° 1-2, pp. 401-404.
- GASSER RB (1999). PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* Vol. 84, pp. 229-258.
- GENCHI C, BOWMAN D et DRAKE J (2014). Canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in Western Europe: survey of veterinary awareness and perceptions. *Parasites & Vectors*. Vol. 7, pp. 206.
- GENCHI C, GENCHI M, PETRY G, KRUEDEWAGEN E et SCHAPER R (2013). Evaluation of the Efficacy of Imidacloprid 10 % / Moxidectin 2.5 % (Advocate®, Advantage® Multi, Bayer) for the Prevention of *Dirofilaria repens* Infection in Dogs. *Parasitology Research*. Vol. 112, n° S1, pp. 81-89.
- GENCHI C, KRAMER LH et RIVASI F (2011). Dirofilarial infections in Europe. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. Vol. 11, n° 10, pp. 1307-1317.
- GENCHI C, MORTARINO M, RINALDI L, CRINGOLI G, TRALDI G et GENCHI M (2011). Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. *Veterinary Parasitology*. Vol. 176, n° 4, pp. 295-299.
- GENCHI C, RINALDI L, MORTARINO M, GENCHI M et CRINGOLI G (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*. Vol. 163, n° 4, pp. 286-292.

- GENCHI C, POGLAYEN G, KRAMER LH, CASIRAGHI M, VENCO L et BRIANTI E (2002). Efficacia di selamectin nella profilassi delle infestazioni da *Dirofilaria repens* del cane. *Veterinaria*. Vol. 16, pp. 69-71.
- GENCHI M, PENGO G et GENCHI C (2010). Efficacy of moxidectin microsphere sustained release formulation for the prevention of subcutaneous filarial (*Dirofilaria repens*) infection in dogs. *Veterinary Parasitology*. Vol. 170, n° 1-2, pp. 167-169.
- GEYER J et JANKO C (2012). Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. Vol. 13, n° 6, pp. 969-986.
- GIANNELLI A, DAUGSCHIES A, DANTAS-TORRES F et OTRANTO D (2013). Comments on potential efficacy of monthly administrations of spot-on moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% in the simultaneous prevention of major canine filarioses. *Parasitology Research*. Vol. 112, n° 11, pp. 3979-3980.
- GIANNELLI A, RAMOS R, TRAVERSA D, BRIANTI E, ANNOSCIA G, BASTELLI F, DANTAS-TORRES, F et OTRANTO D (2013). Treatment of *Dirofilaria repens* microfilariaemia with a combination of doxycycline hyclate and ivermectin. *Veterinary Parasitology*. Vol. 197, n° 3-4, pp. 702-704.
- GIOIA G, LECOVÁ L, GENCHI M, FERRI E, GENCHI C et MORTARINO M (2010). Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Veterinary Parasitology*. Vol. 172, n° 1-2, pp. 160-163.
- GONZÁLEZ-MIGUEL J, MORCHÓN R, CARRETÓN E, MONTOYA-ALONSO J et SIMÓN F (2015). Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? *Parasites & Vectors*. Vol. 8, pp. 194.
- GRANDI G, QUINTAVALLA C, MAVROPOULOU A et GENCHI M (2010). A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). *Veterinary Parasitology*. Vol. 169, n° 3-4, pp. 347-351.
- GUILLOT M (2008). *Aide au diagnostic par une étude comparative des principales parasitoses cardio-circulatoires et respiratoires des carnivores domestiques*. Thèse vétérinaire. Université Claude-Bernard - Lyon 1.
- HARIZANOV RN, JORDANOVA DP et BIKOV IS (2014). Some aspects of the epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of human dirofilariasis caused by *Dirofilaria repens*. *Parasitology Research*. Vol. 113, n° 4, pp. 1571-1579.
- HAYASAKI M, UENO M et EJIMA H (2013). A Possible Port of Entry into the Eye of Dog during Erratic Canine Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Parasitism. *J. Vet. Med. Sci.* Vol. 75, pp. 355-359.
- HETTLICH B, RYAN K et BERGMAN RL (2003). Neurologic complications after melarsomine dihydrochloride treatment for *Dirofilaria immitis* in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 223, n° 10, pp. 1456-1461.
- HIRANO Y, KITAGAWA H et SASAKI Y (1992). Relationship between pulmonary arterial pressure and pulmonary thromboembolism associated with dead worms in canine heartworm disease. *J Vet Med Sci*. Vol. 54, pp. 897-904.
- HOERAUF A, MAND S, FISCHER K, KRUPPA T, MARFO-DEBREKYEI Y, DEBRAH AY, PFARR KM, ADJEI O et BÜTTNER DW (2003). Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis-depletion of *Wolbachia* endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production. *Medical Microbiology and Immunology*. Vol. 192, n° 4, pp. 211-216.

- HUYNH T, THEAN J et MAINI R (2001). Dipetalonema reconditum in the human eye. *The British Journal of Ophthalmology*. Vol. 85, n° 11, pp. 1391-1392.
- IONICĂ AM, D'AMICO G, MITKOVÁ B, KALMÁR Z, ANNOSCIA G, OTRANTO D, MODRÝ D et MIHALCA AD (2014). First report of Cercopithifilaria spp. in dogs from Eastern Europe with an overview of their geographic distribution in Europe. *Parasitology Research*. Vol. 113, n° 7, pp. 2761-2764.
- IONICĂ AM, MATEI IA, MIRCEAN V, DUMITRACHE M, D'AMICO G, GYÖRKE A, PANTCHEV N, ANNOSCIA G, ALBRECHTOVÁ K, OTRANTO D, MODRÝ D et MIHALCA AD (2015). Current surveys on the prevalence and distribution of Dirofilaria spp. and Acanthocheilonema reconditum infections in dogs in Romania. *Parasitology Research*. Vol. 114, n° 3, pp. 975-982.
- JACSÓ O, FOK E, KISS G, KÖKÉNY G et LANG Z (2010). Preliminary findings on the efficacy of selamectin in the treatment of dogs naturally infected with Dirofilaria repens. *Acta Veterinaria Hungarica*. Vol. 58, n° 4, pp. 405-412.
- KOMNENOU A, THOMAS AL, PAPAPOPOULOS E et KOUTINAS AF (2016). Intraocular localization of Onchocerca lupi adult worm in a dog with anterior uveitis: A case report. *Veterinary Ophthalmology*. Vol. 19, n° 3, pp. 245-249.
- KOTANI T et POWERS KG (1982). Developmental stages of Dirofilaria immitis in the dog. *Am J Vet Res*. Vol. 43, pp. 2199-2206.
- KRAMER L, GRANDI G, LEONI M, PASSERI B, MCCALL J, GENCHI C, MORTARINO M et BAZZOCCHI C (2008). Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of Dirofilaria immitis infection. *Veterinary Parasitology*. Vol. 158, n° 3, pp. 191-195.
- KRAMER L, SIMÓN F, TAMAROZZI F, GENCHI M et BAZZOCCHI C (2005). Is Wolbachia complicating the pathological effects of Dirofilaria immitis infections? *Veterinary Parasitology*. Vol. 133, n° 2-3, pp. 133-136.
- LATROFA MS, DANTAS-TORRES F, ASTE G, GENCHI M, TRAVERSA D et OTRANTO D (2012). A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between Dirofilaria immitis and Dirofilaria repens in dogs and mosquitoes. *Veterinary Parasitology*. Vol. 185, n° 2-4, pp. 181-185.
- LATROFA MS, MONTARSI F, CIOCCHETTA S, ANNOSCIA G, DANTAS-TORRES F, RAVAGNAN S, CAPELLI G et OTRANTO D (2012). Molecular xenomonitoring of Dirofilaria immitis and Dirofilaria repens in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis. *Parasites & Vectors*. Vol. 5, pp. 76.
- LATROFA MS, WEIGL S, DANTAS-TORRES F, ANNOSCIA G, TRAVERSA D, BRIANTI E et OTRANTO D (2012). A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta Tropica*. Vol. 122, n° 1, pp. 150-154.
- LEDESMA N et HARRINGTON L (2011). Mosquito Vectors of Dog Heartworm in the United States: Vector Status and Factors Influencing Transmission Efficiency. *Topics in Companion Animal Medicine*. Vol. 26, n° 4, pp. 178-185.
- LEE AC et ATKINS CE (2010). Understanding feline heartworm infection: disease, diagnosis, and treatment. *Topics in Companion Animal Medicine*. Vol. 25, n° 4, pp. 224-230.
- LEE AC, MONTGOMERY SP, THEIS JH, BLAGBURN BL et EBERHARD ML (2010). Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. *Trends in Parasitology*. Vol. 26, n° 4, pp. 168-173.

- LEE SE, KIM HC, CHONG ST, KLEIN TA et LEE WJ (2007). Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. *Veterinary Parasitology*. Vol. 148, n° 2, pp. 149-155.
- LEE SG, MOON HS et HYUN C (2008). Percutaneous heartworm removal from dogs with severe heart worm (*Dirofilaria immitis*) infestation. *Journal of Veterinary Science*. Vol. 9, n° 2, pp. 197-202.
- LEPAGE D et BORDENSTEIN S (2013). Wolbachia: can we save lives with a great pandemic? *Trends in parasitology*. Vol. 29, n° 8, pp. 385-393.
- LICHTENFELDS JR, PILITT PA, KOTANI T et POWERS KG (1985). Morphogenesis of developmental stages of *Dirofilaria immitis* (Nematoda) in the dog. *Proc Helminthol Soc Washington*. Vol. 52, pp. 98-113.
- LIENARD E (2014). *Cours ENVT : La Dirofilariose Cardio-Pulmonaire des Carnivores*. 2014.
- LINDEMANN BA, EVANS TL et MCCALL JW (1983). Clinical responses of dogs to experimentally induced *Dipetalonema reconditum* infection. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 44, n° 11, pp. 2170-2172.
- LITTLE S, BEALL MJ, BOWMAN DD, CHANDRASHEKAR R et STAMARIS J (2014). Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2010-2012. *Parasites & Vectors*. Vol. 7, pp. 257.
- LOMBARD C et ACKERMAN N (1984). Right Heart Enlargement in Heartworm-Infected Dogs. *Veterinary Radiology*. Vol. 25, n° 5, pp. 210-217.
- LUNSFORD KV et MACKIN AJ (2007). Thromboembolic therapies in dogs and cats: an evidence-based approach. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. Vol. 37, n° 3, pp. 579-609.
- MACKINNON A (2000). A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Computers in Biology and Medicine*. Vol. 30, n° 3, pp. 127-134.
- MAGNIS J, LORENTZ S, GUARDONE L, GRIMM F, MAGI M, NAUCKE TJ et DEPLAZES P (2013). Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasit Vectors*. Vol. 6, pp. 48.
- MANI T, BOURGUINAT C, KELLER K, ASHRAF S, BLAGBURN B et PRICHARD RK (2016). Interaction of macrocyclic lactones with a *Dirofilaria immitis* P-glycoprotein. *International Journal for Parasitology*.
- MAO F, LEUNG WY et XIN X (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology*. Vol. 7, pp. 76.
- MAXWELL E, RYAN K, REYNOLDS C et PARIAUT R (2014). Outcome of a heartworm treatment protocol in dogs presenting to Louisiana State University from 2008 to 2011: 50 cases. *Veterinary Parasitology*. Vol. 206, n° 1-2, pp. 71-77.
- MCCALL JW, GENCHI C, KRAMER L et GUERRERO J (2008). Heartworm and Wolbachia : Therapeutic implications. *Veterinary Parasitology*. Vol. 158, pp. 204-214.
- MCCALL JW, GENCHI C, KRAMER LH, GUERRERO J et VENCO L (2008). Heartworm disease in animals and humans. *Advances in Parasitology*. Vol. 66, pp. 193-285.

- MCCALL JW, KRAMER L, GENCHI C, GUERRERO J, DZIMIANSKI MT, SUPAKORNDEJ P, MANSOUR A, MCCALL SD, SUPAKORNDEJ N, GRANDI G et CARSON B (2011). Effects of doxycycline on early infections of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Veterinary Parasitology*. Vol. 176, n° 4, pp. 361-367.
- MCCALL JW, MCTIER TI, RYAN WG, GROSS SJ et SOLL MD (1996). Evaluation of ivermectin and milbemycin oxime efficacy against *Dirofilaria immitis* infections of three and four months' duration in dogs. *American journal of veterinary research*. Vol. 57, n° 8, pp. 1189-1192.
- MCCALL JW, RYAN WG, ROBERTS RE et DZIMIANSKI MT (1998). Heartworm adulticidal activity of prophylactic doses of ivermectin (6µg/kg) plus pyrantel administered monthly to dogs. In : *Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '98*. Seward. pp. 209-215.
- MCCALL JW (2005). The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update, and recommendations. *Veterinary Parasitology*. Vol. 133, pp. 197-206.
- MCGREEVY PB, THEIS JH, LAVOPIERRE MMJ et CLARK J (1974). Studies on filariasis. III. *Dirofilaria immitis*: emergence of infective larvae from the mouthparts of *Aedes aegypti*. *Journal of Helminthology*. Vol. 48, n° 4, pp. 221-228.
- MCHAFFIE J (2012). *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. *Parasitology Research*. Vol. 110, n° 2, pp. 499-502.
- MÉNDEZ JC, CARRETÓN E, MARTÍNEZ-SUBIELA S, TVARIJONAVICIUTE A, CERÓN JJ et MONTOYA-ALONSO JA (2015). Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Veterinary Parasitology*. Vol. 209, n° 3-4, pp. 197-201.
- MENOZZI A, BERTINI S, TURIN L, SERVENTI P, KRAMER L et BAZZOCCHI C (2015). Doxycycline levels and anti-*Wolbachia* antibodies in sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and treated with a combination of ivermectin/doxycycline. *Veterinary Parasitology*. Vol. 209, n° 3-4, pp. 281-284.
- MILLER, M (2012). Heartworm disease. *Veterinary Focus, Royal Canin*. Vol. 22, n° 1, pp. 39-46.
- MISHRA K, RAJ DK, HAZRA RK, DASH AP et SUPAKAR PC (2007). The development and evaluation of a single step multiplex PCR method for simultaneous detection of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol. Cell. Probes*. Vol. 21, pp. 355-362.
- MOORE S, MARIANI C, VAN WETTERE A et BORST LB (2013). Chronic Compressive Myelopathy and Progressive Neurologic Signs Associated with Melarsomine Dihydrochloride Administration in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 49, n° 6, pp. 389-393.
- MORAES-DA-SILVA M, MENDES-DE-ALMEIDA F, ABDALLA L, MERLO A, PAIVA JP et LABARTHE NV (2016). Selamectin for the prevention of canine *Dirofilaria immitis* infection: field efficacy in client-owned dogs in a high risk area. *Parasites & Vectors*. Vol. 9, n° 1, pp. 407.
- MORCHÓN R, BARGUES MD, LATORRE JM, MELERO-ALCÍBAR R, POU-BARRETO C, MAS-COMA S et SIMÓN F (2007). Haplotype H1 of *Culex pipiens* implicated as natural vector of *Dirofilaria immitis* in an endemic area of Western Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. Vol. 7, n° 4, pp. 653-658.
- MORCHÓN R, CARRETÓN E, GONZÁLEZ-MIGUEL J et MELLADO-HERNÁNDEZ I (2012). Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe - New Distribution Trends. *Frontiers in Physiology*. Vol. 3, pp. 196.

- MORCHÓN R, CARRETÓN E, GRANDI G, GONZÁLEZ-MIGUEL J, MONTOYA-ALONSO JA, SIMÓN F, GENCHI C et KRAMER LH (2012). Anti-Wolbachia Surface Protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vol. 12, n° 1, pp. 17-20.*
- MORTARINO M, MUSELLA V, COSTA V, GENCHI C, CRINGOLI G et RINALDI L (2008). GIS modeling for canine dirofilariosis risk assessment in central Italy. *Geospatial health. Vol. 2, n° 2, pp. 253–261.*
- MOZOS E, GINEL PJ, LOPEZ R, CARRASCO L, MULLAS J et MOLLEDA J (1992). Cutaneous Lesions Associated With Canine Heartworm Infection. *Veterinary Dermatology. Vol. 3, n° 4-5, pp. 191-196.*
- NAPOLI E, BRIANTI E, FALSONE L, GAGLIO G, FOIT S, ABRAMO F, ANNOSCIA G, DANTAS-TORRES F, GIANNETTO S et OTRANTO D (2014). Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). *Parasitology. Vol. 141, n° 13, pp. 1718-1725.*
- NAPOLI E, GAGLIO G, FALSONE L, GIANNETTO S, DANTAS-TORRES F, OTRANTO D et BRIANTI E (2014). New insights into the biology and ecology of *Acanthocheilonema reconditum* (spirurida: onchocercidae). *Parasites & Vectors. Vol. 7, n° Suppl 1, pp. O29.*
- OLIVEIRA C, RADEMACHER N, DAVID A, VASANJEE S et GASCHEN L (2010). Spontaneous pneumothorax in a dog secondary to *Dirofilaria immitis* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Vol. 22, pp. 991–994.*
- OLMEDA-GARCÍA AS, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ JA et ROJO-VÁZQUEZ FA (1993). Experimental transmission of *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold 1870) by *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806). *Veterinary Parasitology. Vol. 47, n° 3, pp. 339-342.*
- OPEL KL, BOWMAN D et MCCORD BR (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences. Vol. 55, n° 1, pp. 25-33.*
- OTRANTO D, BRIANTI E, ABRAMO F, GAGLIO G, NAPOLI E, LATROFA MS, RAMOS RA, DANTAS-TORRES F et BAIN O (2012). Cutaneous distribution and localization of *Cercopithifilaria* sp. microfilariae in dogs. *Veterinary Parasitology. Vol. 190, n° 1-2, pp. 143-150.*
- OTRANTO D, BRIANTI E, DANTAS-TORRES F, WEIGL S, LATROFA MS, GAGLIO G, CAUQUIL L, GIANNETTO S et BAIN O (2011). Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. *Veterinary Parasitology. Vol. 182, n° 2-4, pp. 221-229.*
- OTRANTO D, BRIANTI E, LATROFA MS, ANNOSCIA G, WEIGL S, LIA RP, GAGLIO G, NAPOLI E, GIANNETTO S, PAPADOPOULOS E, MIRÒ G, DANTAS-TORRES F et BAIN O (2012). On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. *Parasites & Vectors. Vol. 5, n° 1, pp. 1.*
- OTRANTO D, DANTAS-TORRES F, BRIANTI E, TRAVERSA D, PETRIĆ D, GENCHI C et CAPELLI G (2013). Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors. Vol. 6, pp. 16.*
- OTRANTO D, DANTAS-TORRES F, GIANNELLI A, LATROFA MS, PAPADOPOULOS E, CARDOSO L et CORTES H (2013). Zoonotic *Onchocerca lupi* Infection in Dogs, Greece and Portugal, 2011–2012. *Emerging Infectious Diseases. Vol. 19, n° 12, pp. 2000-2003.*
- OTRANTO D, SAKRU N, TESTINI G, GÜRLÜ V, YAKAR K, LIA RP, DANTAS-TORRES F et BAIN O (2011). Case report: First evidence of human zoonotic infection by *Onchocerca lupi*

(Spirurida, Onchocercidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 84, n° 1, pp. 55-58.

PAES-DE-ALMEIDA EC, FERREIRA AMR, LABARTHE NV, CALDAS MLR et MCCALL JW (2003). Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Veterinary Parasitology*. Vol. 113, n° 2, pp. 157-168.

PANTCHEV N, ETZOLD M, DAUGSCHIES A et DYACHENKO V (2011). Diagnosis of Imported Canine Filariar Infections in Germany 2008 - 2010. *Parasitology Research*. Vol. 109, n° S1, pp. 61-76.

PANTCHEV N, SCHAPER R, LIMOUSIN S, NORDEN N, WEISE M et LORENTZEN L (2009). Occurrence of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections Caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in Domestic Dogs in France: Results of a Countrywide Serologic Survey. *Parasitology Research*. Vol. 105, n° S1, pp. 101-114.

PANTCHEV N, SCHNYDER M, VRHOVEC M, SCHAPER R et TSACHEV I (2015). Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. *Parasitology Research*. Vol. 114, n° S1, pp. 117-130.

PAPAZAHARIADOU MG, KOUTINAS AF, RALLIS TS et HARALABIDIS ST (1994). Prevalence of microfilaraemia in episodic weakness and clinically normal dogs belonging to hunting breeds. *Journal of Helminthology*. Vol. 68, n° 3, pp. 243-245.

PATEL SN, BRAHMBHATT P, NAYAK JB, DESAI ND et KAJE VS (2015). Human *Dirofilariasis* : "An Emerging Zoonosis". *Journal of Foodborne and Zoonotic Diseases*. Vol. 3, n° 3, pp. 39-41.

PATTON CS et GARNER FM (1970). Cerebral infarction caused by heartworms (*Dirofilaria immitis*) in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. Vol. 156, pp. 600-605.

PEETERS D et CLERCX C (2004). La bronchopneumopathie éosinophilique idiopathique canine : revue de la littérature. *Annales de Médecine Vétérinaire*. N° 148, pp. 115-120.

PETRY G, GENCHI M, SCHMIDT H, SCHAPER R, LAWRENZ B et GENCHI C (2015). Evaluation of the Adulticidal Efficacy of Imidacloprid 10 %/Moxidectin 2.5 % (w/v) Spot-on (Advocate®, Advantage® Multi) against *Dirofilaria repens* in Experimentally Infected Dogs. *Parasitology Research*. Vol. 114 Suppl 1, pp. S131-144.

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

POLLONO F, POLLMEIER M et ROSSI L (1998). The prevention of *Dirofilaria repens* infection with ivermectin/pyrantel chewables. *Parassitologia*. Vol. 40, n° 4, pp. 457-459.

PULASKI CN, MALONE JB, BOURGUINAT C, PRICHARD R, GEARY T, WARD D, KLEI TR, GUIDRY T, SMITH G, DELCAMBRE B, BOVA J, PEPPING J, CARMICHAEL J et SCHENKER R (2014). Establishment of macrocyclic lactone resistant *Dirofilaria immitis* isolates in experimentally infected laboratory dogs. *Parasites & Vectors*. Vol. 7, pp. 494.

RAMOS RA, GIANNELLI A, LIA RP, BRIANTI E, TARALLO VD, BREITSHWERDT E, DANTAS-TORRES F, STANNECK, D et OTRANTO D (2014). Incidence of *Cercopithifilaria bainae* in Dogs and Probability of Co-Infection with Other Tick-Borne Pathogens. *PLoS ONE*. Vol. 9, n° 2.

RODRÍGUEZ GARCÍA JF (1990). *Dirofilariasis* canina y otras parasitosis filariales Incidencia, diagnóstico, tratamiento y prevención. *Clinica veterinaria de pequeños animales*. Vol. 10, n° 2, pp. 65-87.

- ROSSI L., FERROGLIO E et AGOSTINI A (2002). Use of moxidectin tablets in the control of canine subcutaneous dirofilariosis. *The Veterinary Record*. Vol. 150, n° 12, pp. 383.
- SACKS B, CHOMEL BB et KASTEN RW, (2004). Modeling the distribution and abundance of the non-native parasite, canine heartworm, in California coyotes. *Oikos*. pp. 415–425.
- SCHNYDER M et DEPLAZES P, (2012). Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasites & Vectors*. Vol. 5, pp. 258.
- SCHRADER C, SCHIELKE A, ELLERBROEK L et JOHNE R (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 113, n° 5, pp. 1014-1026.
- SCHREY F et TRAUTVETTER E (1998). Canine and feline heartworm disease-diagnosis and therapy. *Waltham Focus*. Vol. 8, n° 2.
- SCHWAN EV et SCHRÖTER FG (2006). First record of *Acanthocheilonema dracunculoides* from domestic dogs in Namibia. *Journal of the South African Veterinary Association*. Vol. 77, n° 4, pp. 220-221.
- SERRÃO ML, LABARTHE N et LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R (2001). Vectorial competence of *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) Rio de Janeiro Strain, to *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 96, n° 5, pp. 593-598.
- SILBERMAYR K, EIGNER B, DUSCHER GG, JOACHIM A et FUEHRER H-P (2014). The detection of different *Dirofilaria* species using direct PCR technique. *Parasitology Research*. Vol. 113, n° 2, pp. 513-516.
- SIMÓN F, KRAMER LH, ROMÁN A, BLASINI W, MORCHÓN R, MARCOS-ATXUTEGI C, GRANDI G et GENCHI C (2007). Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Research Communications*. Vol. 31, n° 2, pp. 161-171.
- SIMÓN F, SILES-LUCAS M, MORCHÓN R, GONZÁLEZ-MIGUEL J, MELLADO I, CARRETÓN E et MONTOYA-ALONSO JA (2012). Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 25, n° 3, pp. 507-544.
- SLATKO BE, TAYLOR MJ et FOSTER JM (2010). The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis (Philadelphia, Pa.)*. Vol. 51, n° 1, pp. 55-65.
- SLOCOMBE JOD, SURGEONER GA et SRIVASTAVA B (1989). Determination of the heartworm transmission period and its used in diagnosis and control. In : *Veterinary Nursing Journal*. Charleston, SC : American Heartworm Society. pp. 19-26.
- SRÉTER T, SZÉLL Z, EGYED Z et VARGA I (2002). Subconjunctival zoonotic onchocerciasis in man: aberrant infection with *Onchocerca lupi*? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Vol. 96, n° 5, pp. 497-502.
- SRÉTER T et SZÉLL Z (2008). Onchocercosis: a newly recognized disease in dogs. *Veterinary Parasitology*. Vol. 151, n° 1, pp. 1-13.
- STEFFENS WL, MCCALL JW et MANSOUR AM (1998). Fine structural observations of gut epithelium changes in adult heartworms induced by monthly treatment of dogs with ivermectin/pyrantel. In : *Recent Advances in Heartworm Disease Symposium*.
- TABAR MD, ALTET L, MARTÍNEZ VV et ROURA X (2013). *Wolbachia*, filariae and *Leishmania* coinfection in dogs from a Mediterranean area. *The Journal of Small Animal Practice*. Vol. 54, n° 4, pp. 174-178.

- TARELLO W (2002). Cutaneous lesions in dogs with *Dirofilaria (Nochtiella) repens* infestation and concurrent tick-borne transmitted diseases. *Veterinary Dermatology*. Vol. 13, n° 5, pp. 267-274.
- TARELLO W (2011). Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990-2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *Journal of Parasitology Research*. pp. 578-385.
- TARISH JH et ATWELL RB (1993). The effect of prostaglandin inhibition on the development of pulmonary pathology associated with dead *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*. Vol. 49, n° 2-4, pp. 207-217.
- TRAVERSA D, DI CESARE A, CONBOY G (2010). Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. *Parasites & Vectors*. Vol. 3, pp. 62.
- TRAVERSA D, MAZZI A, DI CESARE A, FAMIGLI BERGAMINI P, FRACASSI F, FANINI G, ASTE G, PAMPURINI F et BOARI A (2013). Potential efficacy of monthly administrations of spot-on moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% in the simultaneous prevention of major canine filarioses. *Parasitology Research*. Vol. 112, n° 11, pp. 3753-3756.
- UNDERWOOD PC et HARWOOD PD (1939). Survival and Location of the Microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the Dog. *The Journal of Parasitology*. Vol. 25, n° 1, pp. 23-33.
- VANAPALLI SR, HUNG YP, FLECKENSTEIN L, DZIMIANSKI MT et MCCALL JW (2002). Pharmacokinetics and dose proportionality of oral moxidectin in beagle dogs. *Biopharm Drug Dispos*. Vol. 23, pp. 263 – 272.
- VELASQUEZ L, BLAGBURN BL, DUNCAN-DECOQ R, JOHNSON EM, ALLEN KE, MEINKOTH J, GRUNTMEIR J et LITTLE SE (2014). Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Veterinary Parasitology*. Vol. 206, n° 1-2, pp. 67-70.
- VENCO L, MCCALL J. W, GUERRERO J et GENCHI C (2004). Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infections in dogs. *Veterinary Parasitology*. Vol. 124, n° 3-4, pp. 259-268.
- VENCO L (1993). Diagnosis of vena cava syndrome. *Veterinaria*. Vol. 7, pp. 11-18.
- VEZZANI D, CARBAJO AE, FONTANARROSA M, SCODELLARO CF, BASABE J, CANGIANO G et EIRAS DF (2011). Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. *Veterinary Parasitology*. Vol. 176, n° 2-3, pp. 240-249.
- VEZZANI D, FONTANARROSA MF et EIRAS DF (2008). Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary results. *Research in Veterinary Science*. Vol. 85, n° 1, pp. 113-115.
- VILLENEUVE A (2014). *La dirofilariose canine: Propositions de traitement et de prévention appropriées au Québec*. Faculté de médecine vétérinaire Sainte-Hyacinthe.
- WANG D, BOWMAN DD, BROWN HE, HARRINGTON LC, KAUFMAN PE, MCKAY T, NELSON CT, SHARP JL et LUND R (2014). Factors influencing U.S. canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) prevalence. *Parasites & Vectors*. Vol. 7, pp. 264.
- WATIER-GRILLOT S, MARIÉ J-L, CABRE O et DAVOUST, B (2011). Survey of Canine *Dirofilaria immitis* Infection in New Caledonia. *Veterinary Medicine International*. Vol. 2011.
- WILSON I G (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63, n° 10, pp. 3741-3751.

WOLSTENHOLME AJ, EVANS CC, JIMENEZ PD et MOORHEAD AR (2015). The emergence of macrocyclic lactone resistance in the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*. Vol. 142, n° 10, pp. 1249-1259.

YOON W-K, HAN D et HYUN C (2011). Catheter-guided percutaneous heartworm removal using a nitinol basket in dogs with caval syndrome. *Journal of Veterinary Science*. Vol. 12, n° 2, pp. 199-201.

Annexes

Annexe 1 : Fiche de consentement éclairé et Fiche d'accompagnement des prélèvements

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires

Dr P.Jacquet : 05.61.19.39.67 p.jacquet@envt.fr

Dr E. Lienard : 05.61.19.39.48 e.lienard@envt.fr

Julie Semat : 06.10.75.81.87 j.semat_11@envt.fr



Fiche de consentement éclairé à destination du propriétaire

Je déclare avoir pris connaissance des informations suivantes :

- Les analyses proposées reposent sur un prélèvement de sang qui sera utilisé pour mettre en place une technique de diagnostic moléculaire de la dirofilariose canine à *Dirofilaria immitis* et *Dirofilaria repens* en mettant en évidence le matériel génétique des microfilaires dans le sang circulant.
- La participation à l'étude est volontaire.
- Les prélèvements, réalisés par un étudiant vétérinaire ou un vétérinaire impliqué dans l'étude ne sont pas facturés.
- Les prélèvements, réalisés par un étudiant vétérinaire ou un vétérinaire impliqué dans l'étude ne sont pas facturés.
- Les analyses seront effectuées au laboratoire de parasitologie et de maladies parasitaires de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Je donne mon accord pour que soit effectué le prélèvement de sang sur mon animal dans le cadre de l'étude sur la dirofilariose canine.

Date :

Nom et Prénom :

Signature :

Précédée de la mention « lu et approuvé »

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires

Dr P.Jacquet : 05.61.19.39.67 p.jacquet@envt.fr

Dr E. Lienard : 05.61.19.39.48 e.lienard@envt.fr

Julie Semat : 06.10.75.81.87 j.semat_11@envt.fr



Thèse Vétérinaire Julie SEMAT

Formulaire d'accompagnement des prélèvements

Nom du Vétérinaire :	Nom du propriétaire :
Adresse :	Adresse :
.....	Téléphone :
.....	Mail :
Téléphone :	Nom de l'animal :
Mail :	Date de naissance :
	Race :
	Sexe : <input type="checkbox"/> Mâle <input type="checkbox"/> Femelle

Signes cliniques compatibles avec la dirofilariose à *D. immitis* :

- Fatigabilité à l'effort Toux chronique Dyspnée Microfilaires au frottis sanguin
 SNAP 4DX positif Autres :

Signes cliniques compatibles avec la dirofilariose à *D. repens* :

- Nodules sous-cutanés Microfilaires au frottis sanguin Autres :

Vermifugation

Date de la dernière vermifugation : Fréquence des traitements :

- Vermifuge utilisé : Milbemax® Drontal® Dolpac® Panacur® Stronghold®
 Advocate® Autre :

Antiparasitaire externe

Date du dernier traitement : Fréquence des traitements :

- Produit utilisé : Frontline® Advantix® Vectra 3D Seresto® Scalibor®
 Comfortis® Nexgard® Bravecto® Autre :

Mode de vie de l'animal

Lieu de vie :

- Conditions de vie : En ville A la campagne En bord de mer
 Appartement Maison avec jardin En extérieur

Prise de sang effectuée sur tube EDTA (3 mL de sang minimum)

Date du prélèvement :

- Conservation du prélèvement : Réfrigération (durée maximale de conservation : 1 semaine)
 Congélation du sang total

Annexe 2 : Taux de réponse et de participation des vétérinaires contactés

	Nombre de vétérinaires contactés	Nombre de réponses aux mails	Nombre de vétérinaires ayant fait parvenir des prélèvements	Nombre de prélèvements reçus
Bouches-du-Rhône	96	3	0	0
Alpes-Maritimes	65	0	0	0
Var	52	1	1	0
Var - Refuge de Flayosc	1	1	1	15
Corse	22	0	0	0
La Réunion	42	6	3	30
Guadeloupe	21	5	1	4
Martinique	8	0	0	0
Guyane	5	3	0	0
Nouvelle Calédonie	17	4	3	12
Haute Garonne	1	1	1	4
				65

Annexe 3 : Liste des chiens inclus dans l'étude et résultats des différents tests

Chiens prélevés en France - ENVT & VERNET - 4 chiens - 3 prélèvements réfrigérés / 1 congelé														
Commémoratifs											Résultats			
Chien	Vétérinaire	Sexe	Race	Âge	Signes cliniques	Test de détection d'antigènes	Microfilaires au frottis	Voyages ?	API	APE	Type prélèvement (congelé/réfrigéré)	SNAP 4 DX	Filarassay	qPCR
ENVT1	ENVT	Mâle	Braque allemand	11 ans	Masse cutanée jarret droit	4DX négatif	+	Non			Congelé	Négatif	Positif	Positive pour <i>D. Repens</i>
ENVT2	ENVT	Femelle	Setter anglais	7 ans	Toux émetisante hémoptysie	4DX négatif	+	Non	Inconnu 1 fois/an	Advantix tous les 6 mois	Réfrigéré	Négatif	Positif	Positive pour <i>D. Repens</i>
V1	Le VERNET Docteur Mahmoudi	Mâle	Dogue Argentin	13 ans	Nodules sous cutanés	Kitvia négatif	+	Non	Non	Bravecto le 19-05-2016	Réfrigéré	Négatif	Positif	Positive pour <i>D. Repens</i>
V2	Le VERNET Docteur Charru	Mâle	Malinois	4,5 ans	Fatigabilité à l'effort Flaire dans le cœur droit	Kitvia négatif	-	Espagne en 2014	Milbemax 15-02-2016 (3 fois/an)	Advantix 15-04-2016	Réfrigéré	Négatif	Négatif	Négatif

Chiens prélevés au refuge de Flayosc (83) - 15 chiens - Prélèvements réfrigérés											
Commémoratifs										Résultats	
Chien	Sexe	Race	Âge	Mode de vie	Signes cliniques	Voyages	API	APE	SNAP 4 DX	Filarassay	qPCR
F1	Femelle	Chien loup Tchèque	10 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Octobre 2015	Scalibor	Négatif	Négatif	Négatif
F2	Mâle	x Epagneul breton	3 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Décembre 2015	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F3	Mâle	x Chien courant	3 ans	Extérieur	Diarrhée avec sang --> Giardiose a reçu Flagyl	Non	Milbemax en Décembre 2015	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F4	Mâle	Epagneul Breton	3,5 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F5	Femelle	x épagneul	3 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F6	Femelle	x Berger australien	3 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F7	Femelle	x Berger	4 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F8	Femelle	x Beauceron	2 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F9	Mâle	Epagneul Breton	2 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F10	Femelle	x Bichon	4 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F11	Mâle	x Chien courant	7 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F12	Mâle	Amstaff	7 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Octobre 2015	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F13	Femelle	Ariégeois	5 ans	Extérieur	Teigne en Déc15 : traitement Fulviderm	Non	Stronghold en Novembre 2015	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F14	Femelle	x Bichon	7 ans	Extérieur	Non	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif
F15	Femelle	x Lhasa apso	5 ans	Extérieur	Leishmaniose traitée avec glucantime (arrêt il y'a 1semaine) + allopurinol	Non	Milbemax en Janvier 2016	Non	Négatif	Négatif	Négatif

Chiens prélevés en Guadeloupe - 4 chiens - Prélèvements congelés										
		Commemoratifs					Résultats			
Chien	Vétérinaire	Lieu	Sexe	Âge	Race, API, APE, clinique	Snap 4DX positif pour <i>Dirofilaria immitis</i>	Microfilaires au frottis sanguin	SNAP 4 DX	Filarassay	qPCR
G1			?	?		X	?	Positif	Négatif	Négative
G2	Docteur IBENE Olivier	Sainte Anne	Mâle	6 ans	Non connus	X	?	Positif	Positif >2/champs en x100	Positif pour <i>D. immitis</i> (dilué au 1/10)
G3			Mâle	10 ans		X	?	Positif	Positif >3/champs en x100	Positif pour <i>D. immitis</i>
G4			Mâle	6 ans		X	Oui	Positif	Positif 1/champs en x100	Positif pour <i>D. immitis</i>

Chiens prélevés à la RÉUNION - 30 chiens - Prélèvements congelés												
Chiens	Vétérinaire	Lieu	Commemoratifs					Résultats				Remarques
			Sexe	Race	Âge	API/APE	Motif du prélèvement	SNAP 4 DX® pour <i>D. immitis</i>	Filarassay®	qPCR		
R1			Femelle	X Pinscher	1,5 an	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Non réalisé*	Négatif		
R2			Femelle	X Labrador	2,5 ans	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Non réalisé*	Négatif		*Trop peu de sang prélevé pour réaliser le Filarassay®
R3	Docteur Ramsamy	SPA Tampon	Mâle	X Berger	6 mois	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Non réalisé*	Négatif		
R4			Mâle	X Malinois	8 mois	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Non réalisé*	Négatif		
R6			Femelle	X Pinscher	6 mois	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Non réalisé*	Négatif		
R7			Mâle	X Berger	6 mois	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Non réalisé*	Négatif		
R8			Femelle	X Berger	9 mois	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Non réalisé*	Négatif		
R9			Femelle	X Berger	6 mois	Aucun	Aucun	Négatif		Négatif		
R10	Docteur Melot	St Gilles	Femelle	X Berger	10 ans	Aucun	Snap 4DX positif pour <i>D. immitis</i> et microfilaires au frottis	Positif	Positif >5/champs en x100	Positif pour <i>D. immitis</i>		Snap + Ehrlichia
R11			Femelle	X Berger	1,5 an	Aucun	Chiennne errante	Positif	Négatif	Négative		Snap + Ehrlichia
R12			Femelle	X Pinscher	2 ans	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
R13			Femelle	X Epagneul Papillon	4 ans	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
R14	Docteur Ramsamy	SPA Tampon	Femelle	X Pinscher	1,5 an	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
R15			Femelle	X Corgi	2 ans	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
R16			Femelle	X Epagneul Papillon	1 an	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
R17			Femelle	X Berger	1,5 an	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
R18			Femelle	X Pinscher	9 mois	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
R19	Femelle	X Berger	8 mois	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative				
RA			Femelle	X Pinscher	4 ans	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
RB			Mâle	Croisé	1,5 an	Aucun	Chien errant	Négatif	Négatif	Négative		
RC			Mâle	Pinscher	3 ans	Aucun	Chien errant	Négatif*	Négatif	Négative		Snap + Ehrlichia
RE			Femelle	Croisé 10 kg	1 an	Aucun	Chiennne errante	Négatif*	Négatif	Négative		Snap + Ehrlichia et Anaplasma
RF		Fourrière St Paul	Mâle	Croisé	6 mois	Aucun	Chien errant	Négatif	Négatif	Négative		
RG			Mâle	Malinois	5 ans	Aucun	Chiennne errante	Positif	Négatif	Négative		Snap + Ehrlichia
RH	Docteur Thomas		Femelle	berger allemand	1,5 an	Aucun	Chiennne errante	Négatif*	Négatif	Négative		Snap + Ehrlichia
RI			Femelle	Croisé	1,5 an	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
RJ			Femelle	Briard	3 ans	Aucun	Chiennne errante	Négatif	Négatif	Négative		
RK			Mâle	Pinscher	6 mois	Aucun	Chien errant	Négatif	Négatif	Négative		
RL			Femelle	Dalmatien	2 ans	Drontal et Frontline	Fatigabilité à l'effort, Snap 4DX positif pour <i>Diroflaria immitis</i>	Positif	Positif <1/champs en x100	Positif pour <i>D. immitis</i>		
RM		Association RRA	Femelle	X Pinscher	6 mois	Aucun	Chiennne errante	Positif	Négatif	Négative		Snap + Ehrlichia

Chiens prélevés en Nouvelle-Calédonie - 12 Chiens - Sang congelé													
Commemoratifs											Résultats		
Chien	Vétérinaire	Sexe	Race	Âge	API	APE	Signes cliniques	Snap 4DX +	Microfilariaes au frottis	Date du prélèvement	SNAP 4 DX	Filarassay	qPCR
NC1		Mâle	Croisé	11 ans	Lopatol en 2013	Nexgard en Février 2016 (1-2 fois/an)	Fatigabilité à l'effort	Négatif	Non	25/02/2016	Négatif	Négatif	Négatif
NC2	Docteur Frantz	Mâle	Bouvier australien	3 ans	Milbemax en Nov 2013	Nexgard en Novembre 2014	Fatigabilité à l'effort	Positif	Microfilariaes au frottis	23/02/2016	Positif	Positif 5/champs en x100	Positif pour D. immitis
NC3	(Kone)	Femelle	Bouvier australien	5 ans	Drontal en Déc 2012	Cevamec en Janvier 2012	Aucun	Négatif	Non	07/03/2016	Négatif	Négatif	Négatif
NC4		Femelle	Croisée (30kg)	3,5 ans	Drontal en Déc 2015 (2 fois/an)	Nexgard tous les 2-3 mois	Fatigabilité à l'effort	Négatif	Non	02/02/2016	Négatif	Négatif	Négatif
NC5		Mâle	Croisé	5 ans (estimé)	?	?	Aucun (chien errant)	Positif	Non	mars-16	Positif	Négatif	Négatif
NC6	Docteur Leaigneur	Mâle	Croisé	1 an	?	?	Aucun (chien errant)	Positif	Non	02/02/2016	Positif	Positif 1-2/champs en x100	Positif pour D. immitis
NC7	(Nouméa)	Mâle	Berger allemand	5 ans	?	?	Aucun (chien errant)	Positif	Microfilariaes au frottis	02/02/2016	Positif	Négatif (douteux)	Positif pour D. immitis
NC8		Mâle	Croisé	1 an	?	?	Aucun (chien errant)	Positif	Non	avr-16	Positif	Positif 1-2/champs en x100	Positif pour D. immitis
NC9		Femelle	Labrador	2 ans	Milbemax en Juin 2014	Frontline/Nexgard 2 fois/an (Déc 15)	Aucun	Positif	Microfilariaes au frottis	25/04/2016	Positif	Positif 2-3/champs en x100	Positif pour D. immitis
NC10	Docteur Frantz	Femelle	Dobermann	6,5 ans	Milbemax 1 fois/an	?	Aucun	Négatif	Non	02/06/2016	Négatif	Négatif	Négatif
NC11	(Kone)	Mâle	Pittbull	3 ans	Cevamec en Déc 13 pour Démodécie	Aucun	Aucun	Positif	Microfilariaes au frottis	06/04/2016	Positif	Positif 1/champs en x100	Positif pour D. immitis (après dilution au 1/10e)
NC12		Femelle	Croisée Griffon	3 ans	Drontal 1-2 fois/an	Nexgard depuis Fév 16 (ras avant)	Aucun	Positif	Microfilariaes au frottis	24/03/2016	Positif	Positif 5/champs en x100	Positif pour D. immitis

Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN avec le kit QIAGEN « QIAamp®DNA Mini Kit »

	SANG	PEAUX/ORGANES
Préparation de l'échantillon	<p>Dans un tube de 2 ml, prélever 1 ml de sang EDTA</p> <p>Ajouter 1 ml d'eau PPI</p> <p>Vortexer.</p> <p>Incuber 10 min sur glace en agitant de temps en temps.</p> <p>Centrifuger 5 min à 6 000g.</p> <p>Eliminer le surnageant.</p> <p>Ajouter au culot 1 ml d'eau PPI.</p> <p>Vortexer.</p> <p>Centrifuger 5 min à 6 000g.</p> <p>Eliminer le surnageant.</p>	<p>Dans un microtube, prélever 0,05g de peau lacéré</p>
Lyse N°1	Ajouter 180 µl de « Buffer ATL », 20 µl de protéinase K Vortexer.	
Incubation N°1	Incuber 1 nuit au bain marie ou bloc chauffant à 56°C <u>OU</u> Incuber 30 minutes au bain marie ou bloc chauffant à 70°C .	Incuber 1 nuit au bain marie ou bloc chauffant à 56°C
Lyse N°2	Ajouter 200 µl de « Buffer AL »	
	Vortexer.	
Incubation N°2	Incuber 10 minutes au bain marie ou bloc chauffant à 70°C	
Transfert sur colonne et fixation à la membrane	Ajouter 210 µl d'éthanol (96-100 %) .	
	Vortexer 15 secondes (centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttes si nécessaire).	
	Transférer la totalité de chaque échantillon sur une colonne.	Centrifuger 1 min à 1 000 g
	Centrifuger 1 minute 10 000 g	Transférer la totalité du surnageant sur une colonne.
		Centrifuger 1 minute 10 000 g
Lavage N°1	Changer de tube collecteur.	
	Ajouter 500 µl de « Buffer AW1 ».	
	Centrifuger 1 minute 10 000g.	
Lavage N°2	Changer de tube collecteur.	
	Ajouter 500 µl de « Buffer AW2 ».	
	Centrifuger 3 minutes 10 000g.	
Séchage de la colonne	Changer de tube collecteur.	
	Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Elution	Transférer la colonne sur un microtube de 1,5 ml.	
	Déposer 200 µl de « Buffer AE ».	
	Incuber 1 minute à température ambiante.	
	Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Conservation	Boucher les tubes, identifier les et conserver les à +2/8°C si l'analyse est réalisée dans les 24 heures qui suivent. Pour une conservation à plus long terme, stocker les tubes à -20°C +/-5°C.	

▪ **Annexe 5 : Résultats des PCR en temps réel réalisées**

Lieu	Chien	Résultats de la qPCR							
		ADN extrait pur			ADN extrait dilué au 1/10ème			Tm	Espèce
ENVY (31)	ENVY1	No Ct	No Ct	No Ct	28,97	28,75	28,78	Tm=70,7°C	<i>D. Repens</i>
	ENVY2	No Ct	No Ct	No Ct	31,44	31,1	31,8	Tm=70,9°C	<i>D. Repens</i>
Flayosc (83) 15 Chiens	F1	37,89	37,65	37,41	37,14	37,27	37,19	Négatif	
	F2	37,81	38,62	37,58	38,16	38,04	39,99	Négatif	
	F3	39,08	39,1	37,39	37,97	37,35	36,32	Négatif	
	F4	37,95	37,28	37,28	37,89	38,86	37,44	Négatif	
	F5	37,98	37,44	37,39	37,34	38,31	37,60	Négatif	
	F6	38,44	36,65	37,63	38,01	37,42	37,65	Négatif	
	F7	37,95	38,92	37,85	No Ct	No Ct	No Ct	Négatif	
	F8	38,15	36,14	35,73	38,78	No Ct	No Ct	Négatif	
	F9	37,80	37,63	36,33	37,65	37,00	37,31	Négatif	
	F10	38,00	38,59	37,82	37,34	36,90	37,21	Négatif	
	F11	No Ct	38,91	37,12	No Ct	No Ct	No Ct	Négatif	
	F12	37,87	37,12	37,26	36,75	38,75	37,21	Négatif	
	F13	37,12	37,46	37,45	No Ct	No Ct	39,43	Négatif	
	F14	36,43	38,66	37,93	37,22	37,65	37,41	Négatif	
	F15	39,19	37,53	35,89	37,91	38,10	37,52	Négatif	
Le Vernet (31)	V1	No Ct	No Ct	No Ct	33,32	32,62	32,11	Tm=70,8°C	<i>D. Repens</i>
	V2	No Ct	No Ct	No Ct	35,44	No Ct	36,46	Négatif	
Guadeloupe 4 chiens	G1	No Ct	No Ct	No Ct	36,96	37,34	37,66		
	G2	No Ct	No Ct	No Ct	23,63	23,49	23,57	Tm = 76,6 °C	<i>D. Immitis</i>
	G3	19,78	19,94	19,42	22,98	23	22,99	Tm = 76,6 °C	<i>D. Immitis</i>
	G4	22,55	22,84	22,93	25,05	25,16	25,05	Tm = 76,6 °C	<i>D. Immitis</i>
La Réunion 30 chiens	R1	No Ct	No Ct	39,26	39,07	38,37	38,12	Négatif	
	R2	No Ct	No Ct	No Ct	38,53	38,80	37,99	Négatif	
	R3	No Ct	37,74	38,73	37,96	38,43	38,95	Négatif	
	R4	No Ct	39,76	39,80	38,93	37,74	38,35	Négatif	
	R6	No Ct	No Ct	No Ct	37,15	38,97	38,05	Négatif	
	R7	No Ct	No Ct	No Ct	37,22	37,92	37,32	Négatif	
	R8	No Ct	No Ct	38,62	37,50	38,12	39,00	Négatif	
	R9	No Ct	No Ct	No Ct	39,90	No Ct	No Ct	Négatif	
	R10	22,04	21,69	21,63	26,19	26,00	26,18	Tm = 76,6 °C	<i>D. Immitis</i>
	R11	No Ct	No Ct	No Ct	37,20	36,78	38,40	Négatif	
	R12	No Ct	No Ct	No Ct	39,80	38,85	39,34	Négatif	
	R13	No Ct	No Ct	No Ct	39,08	38,37	39,12	Négatif	
	R14	No Ct	No Ct	No Ct	38,85	38,26	38,29	Négatif	
	R15	No Ct	No Ct	No Ct	38,41	39,73	38,55	Négatif	
	R16	38,45	37,85	38,57	38,53	39,81	37,99	Négatif	
	R17	39,46	38,53	39,55	39,73	39,45	39,90	Négatif	
	R18	38,83	37,90	38,94	36,94	37,68	39,53	Négatif	
	R19	39,05	38,43	38,14	39,58	38,99	39,43	Négatif	
	R A	No Ct	No Ct	No Ct	38,35	38,14	38,15	Négatif	
	R B	No Ct	No Ct	No Ct	37,80	37,72	38,29	Négatif	
R C	No Ct	No Ct	No Ct	37,82	38,01	38,56	Négatif		
R E	No Ct	No Ct	No Ct	38,71	37,52	37,17	Négatif		
R F	No Ct	No Ct	No Ct	37,50	37,97	38,45	Négatif		
R G	No Ct	No Ct	No Ct	38,82	37,93	37,51	Négatif		
R H	No Ct	No Ct	No Ct	37,68	37,00	38,59	Négatif		
R I	38,80	39,19	No Ct	38,45	38,65	38,64	Négatif		
R J	No Ct	No Ct	No Ct	37,59	37,11	38,18	Négatif		
R K	38,96	No Ct	No Ct	38,40	38,77	37,49	Négatif		
R L	21,69	23,92	22,00	24,23	24,02	23,91	Tm = 76,5 °C	<i>D. Immitis</i>	
R M	No Ct	No Ct	No Ct	37,58	38,40	37,35	Négatif		
Nouvelle-Calédonie 12 chiens	NC1	No Ct	38,63	38,68	35,85	35,88	35,39	Négatif	
	NC2	20,94	20,47	20,70	23,81	24,03	23,95	Tm = 76,9 °C	<i>D. Immitis</i>
	NC3	No Ct	No Ct	No Ct	35,47	35,57	35,56	Négatif	
	NC4	37,55	36,07	36,68	37,44	37,92	No Ct	Négatif	
	NC5	No Ct	37,48	37,68	39,94	39,29	No Ct	Négatif	
	NC6	19,69	19,64	19,63	23,03	23,14	23,56	Tm = 76,8 °C	<i>D. Immitis</i>
	NC7	25,73	25,19	25,10	28,71	28,64	28,49	Tm = 76,9 °C	<i>D. Immitis</i>
	NC8	20,14	20,60	20,89	24,10	24,30	24,28	Tm = 76,9 °C	<i>D. Immitis</i>
	NC9	No Ct	22,26	23,70	21,17	20,51	20,47	Tm = 76,9 °C	<i>D. Immitis</i>
	NC10	39,34	38,01	38,45	No Ct	No Ct	No Ct	Négatif	
	NC11	No Ct	No Ct	No Ct	21,98	21,60	21,65	Tm = 76,8 °C	<i>D. Immitis</i>
	NC12	No Ct	23,67	22,45	20,97	20,81	20,51	Tm = 76,8 °C	<i>D. Immitis</i>

Annexe 6 : Purification du produit d'amplification de PCR avec le Kit d'extraction d'ADN QIAquick PCR Purification Kit Ref 28106

Après l'étape d'amplification par PCR le produit obtenu doit être nettoyé pour éliminer le tampon, les dNTP non incorporés et les amorces.

- 1- Associer dans un tube eppendorf de 1,5 ml le contenu de réaction de 50 µl de PCR.
- 2- Ajouter 250 µl de tampon PB au 50 µl de réaction PCR puis vortexer pour homogénéiser le mélange.
- 3- Assembler une colonne de purification et un tube collecteur puis déposer sur la colonne la totalité du mélange PCR + PB buffer (environ 300µl).
- 4- Centrifuger 1 min à 13000 rpm (17900g) room T° puis jetez le filtrat présent dans le tube collecteur et remettez la colonne dans le tube collecteur.
- 5- Ajouter 750 µl de tampon de lavage PE puis centrifuger 1 min à 13000 rpm.
- 6- Jetez le filtrat présent dans le tube collecteur et remettez la colonne dans le tube collecteur ET Sécher la membrane de silice en centrifugeant la colonne et le tube collecteur 2 min à 13000 rpm.
- 8- Placer la colonne de purification dans un eppendorf propre de 1,5 ml et ajout de 30 µl d'eau (ou Buffer EB) au centre de la colonne et incubé 3 min à température ambiante.
- 9- Eluer le produit PCR en centrifugeant 1 min à 13000 rpm.
- 10- Placer le tube eppendorf contenant le produit dans la glace.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné, Philippe JACQUIET, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **SEMAT Julie** intitulée « **Mise en place d'une méthode de diagnostic moléculaire par PCR quantitative pour détecter et identifier les microfilaries sanguines de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* chez le chien.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 4 novembre 2016
Professeur Philippe JACQUIET
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 :
Professeur Antoine BERRY



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

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Toulouse 2016

Nom : Julie Semat

Titre: Mise en place d'une méthode de diagnostic moléculaire par PCR quantitative pour détecter et identifier les microfilaries sanguines de *Dirofilaria immitis* et de *Dirofilaria repens* chez le chien

Dirofilaria immitis et *Dirofilaria repens* sont les deux principales espèces responsables de filarioses canines en Europe. *D.immitis* est l'espèce la plus pathogène chez le chien et est à l'origine de la dirofilariose cardio-pulmonaire. *D.repens* est impliquée dans la dirofilariose sous-cutanée canine qui reste le plus souvent asymptomatique. Ces deux espèces ont un potentiel zoonotique, d'où l'importance de les dépister et de les traiter afin d'éviter qu'ils ne servent de réservoir à l'infestation humaine.

La partie expérimentale de ce travail de thèse a permis de mettre en place une PCR quantitative qui détecte simultanément et différencie les microfilaries libérées dans le sang par les vers adultes de ces deux espèces. Les formes amicrofilarémiques ne sont donc pas détectables avec cette méthode de diagnostic moléculaire. Des prélèvements sanguins ont été réalisés sur 65 chiens provenant de France métropolitaine et des DOM-TOM : 3 étaient infestés par *D.repens*, 17 par *D.immitis* dont 12 avec une microfilarémie.

Mots clés : Dirofilariose canine, PCR quantitative, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*

Name : Julie Semat

Title: Implement of a multiplex quantitative PCR for simultaneous detection and differentiation of microfilariae of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dog blood

Dirofilaria immitis and *Dirofilaria repens* are the major filarioids species found in dogs in Europe. *D.immitis* is the most pathogenic and causes heartworm disease that can be fatal. *D.repens* can cause subcutaneous disease in dogs but infection is asymptomatic most of the time. These two worm species have a zoonotic potential, so it is important to detect and eliminate them to prevent them becoming a reservoir for human populations.

The experimental part of this work enabled us to implement a multiplex quantitative PCR for simultaneous detection and differentiation of microfilariae of *D.immitis* and *D.repens*. Occult forms therefore cannot be detected by this method. A total of 65 blood samples were obtained from dogs coming from both mainland France and Overseas Departments and Territories: 3 were infested by *D.repens*, 17 by *D.immitis* among which 12 were microfilariaemic.

Key words : Canine dirofilariosis, Real time PCR, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*