

Etude comparative de l'infection par le parvovirus canin, le virus de la maladie de carré et le coronavirus entérique canin chez les loups en liberté du centre de l'Italie et du sud-est de la France

Eur J Wildl Res (2014) 60:613–624
DOI 10.1007/s10344-014-0825-0

ORIGINAL PAPER

Comparative survey of canine parvovirus, canine distemper virus and canine enteric coronavirus infection in free-ranging wolves of central Italy and south-eastern France

Barbara Molnar · Christophe Duchamp · Karin Möstl · Peter-Allan Diehl · Bruno Betschart

Résumé

Les maladies affectent probablement la démographie des grands carnivores et peuvent entraver les efforts de conservation. Nous avons examiné trois virus hautement contagieux qui infectent un large éventail de mammifères domestiques et sauvages : le **parvovirus canin de type 2** (CPV-2), le **virus de la maladie de Carré** (CDV) et les **coronavirus entériques canins** (CECoV). L'infection par l'un ou l'autre de ces virus peut affecter les populations en augmentant la mortalité et/ou en diminuant la santé générale. Nous avons étudié l'infection dans les populations de loups du Parc National d'Abruzzo, Lazio e Molise (PNALM), en Italie, et du Parc National du Mercantour (PNM), en France. Des échantillons fécaux ont été collectés pendant un hiver, d'octobre à mars, dans quatre meutes du PNALM ($n = 79$) et dans quatre meutes du PNM ($n = 66$). Nous avons recherché dans les échantillons des séquences spécifiques d'acides nucléiques viraux. **À notre connaissance, notre étude est le premier rapport documenté de l'infection par le CECoV chez les loups en dehors de l'Alaska, et de l'occurrence à grande échelle du CPV-2 dans les populations de loups Européens.** Les résultats suggèrent que le CPV-2 est **enzootique** dans la population du PNALM, mais pas dans le PNM et que le CECoV est épisodique dans les deux régions. **Nous n'avons pas détecté le CDV.** Nos résultats suggèrent que la densité et la distribution spatiale des hôtes sensibles, en particulier les chiens en liberté, peuvent être des facteurs importants influençant les infections chez les loups. Cette étude comparative est une étape importante dans l'évaluation de la nature des menaces possibles de maladies dans les populations de loups étudiées. La réapparition de nouvelles souches virales en Europe renforce en outre la nécessité d'une surveillance proactive des loups et d'autres espèces sympatriques sensibles aux menaces virales et autres infections nuisibles.

INTRODUCTION

Le déclin des populations induit par des maladies a été signalé chez plusieurs espèces de grands carnivores, et la plupart des événements épidémiques semblent être causés par des **virus** (Murray et al. 1999). Même lorsque les effets des maladies ne sont pas épizootiques et sont apparemment sublétaux, les agents pathogènes peuvent affecter la taille ou la **résilience** des populations hôtes infectées et augmenter la probabilité d'un déclin causé par d'autres facteurs (Cleveland et al. 2002).

Lorsque les infections sont endémiques chez les **hôtes réservoirs** et transmises horizontalement entre les taxons, la menace d'épidémies chez les grands carnivores peut être importante, **car les effets démographiques de la maladie peuvent se produire indépendamment de la taille de la population hôte ou du taux de transmission de la maladie** (Murray et al. 1999). La propagation d'agents pathogènes existants et émergents chez les animaux en liberté peut provoquer des changements rapides dans l'abondance et la diversité génétique des populations sensibles (Altizer et al. 2003).

Le parvovirus canin de type 2 (CPV-2) et le virus de la maladie de Carré (CDV) sont des agents pathogènes bien connus des canidés et leur présence est signalée dans plusieurs populations de loups en liberté en Europe et dans le monde (Kreeger 2003 ; Zarnke et al. 2004 ; Frölich et al. 2005 ; Sobrino et al. 2008 ; Almberg et al. 2009 ; Santos et al. 2009 ; Di Sabatino et al. 2014). L'infection par les Alphacoronavirus (ACVs) est peu documentée dans les populations de canidés vivant en liberté. Les variants des ACV qui infectent les canidés sont les coronavirus entériques canins de type I et II (CECoV). **Les coronavirus entériques canins ont été détectés chez les loups uniquement en Alaska** (Zarnke et al. 2001). Néanmoins, ce virus à évolution rapide semble être enzootique dans le monde entier chez les chiens (Pratelli 2006) et a récemment fait l'objet d'une attention accrue en Europe (Benetka et al. 2006 ; Buonavoglia et al. 2006 ; Decaro et Buonavoglia 2008 ; Decaro et al. 2008). La transmission de nombreux virus est fortement influencée par les densités locales de carnivores (Murray et al. 1999). Les chiens peuvent transmettre chacun de ces trois pathogènes à d'autres carnivores, par contact direct (ex. salive) ou par contact avec des matières contaminées (ex. fèces, vomissures ; Kreeger 2003), et peuvent donc introduire et/ou contribuer à maintenir l'infection dans les populations de loups sensibles.

Le parvovirus canin de type 2, la CDV et le CECoV sont des agents pathogènes hautement contagieux qui peuvent infecter un large éventail d'espèces domestiques et en liberté (Deem et al. 2000 ; Buonavoglia et al. 2006 ; de Oliveira Hübner et al. 2010 ; Nandi et Kumar 2010). L'infection par chacun de ces virus a été associée à une morbidité et une mortalité élevée chez les carnivores domestiques et en liberté, y compris les loups (Johnson et al. 1994 ; Pence 1995 ; Gese et al. 1997 ; Di Sabatino et al. 2014), les symptômes les plus graves étant généralement signalés chez les jeunes individus (Murray et al. 1999 ; Deem et al. 2000 ; Kreeger 2003 ; Pratelli 2006 ; Almberg et al. 2009 ; Nandi et Kumar 2010 ; Mech et Goyal 2011). L'infection par la maladie de Carré provoque généralement une pneumonie, une encéphalite et/ou une diarrhée (Murray et al. 1999 ; Deem et al. 2000 ; Kreeger 2003). Le parvovirus canin de type 2 et le CECoV affectent principalement l'intestin grêle, provoquant une entérite parfois grave et une déshydratation conséquente (Kreeger 2003 ; Pratelli 2006 ; Decaro et Buonavoglia 2008). En outre, l'infection fœtale ou néonatale par le CPV-2 peut déclencher une myocardite grave (Kreeger 2003). L'infection systémique par la CDV ou le CECoV peut également provoquer diverses manifestations neurologiques (Deem et al. 2000 ; Kreeger 2003 ; Buonavoglia et al. 2006). La co-infection par le CPV-2 et le CECoV est associée à des symptômes plus graves (Decaro et al. 2006 ; Pratelli 2006). **De nouveaux variants de chacun de ces trois virus ont été récemment identifiés en Italie et dans d'autres pays d'Europe occidentale, dont certains présentent une virulence accrue et une plus grande capacité de transmission horizontale** (Buonavoglia et al. 2001, 2006 ; Evermann et al. 2005 ; Martella et al. 2005 ; Decaro et Buonavoglia 2008 ; Le Poder 2011 ; Monne et al. 2011 ; Origgi et al. 2012 ; Di Sabatino et al. 2014). Ces **variants** résultent de mutations et d'événements de recombinaison dans les virus locaux et peut-être aussi de l'importation d'animaux infectés en provenance d'autres pays (Benetka et al. 2006 ; Buonavoglia et al. 2006 ; Demeter et al. 2007 ; Allison et al. 2012 ; Origgi et al. 2012). Ces

caractéristiques communes du CPV-2, du CDV et du CECov en font des menaces importantes pour la conservation des espèces hôtes sensibles. L'impact de l'infection sur les populations de loups en recolonisation pourrait être exacerbé par rapport aux grandes populations bien établies (Johnson et al. 1994).

Les loups vivent typiquement en meutes familiales, composées d'un couple reproducteur et de leur progéniture d'une ou plusieurs générations, née au début du printemps (Packard 2003). La sous-espèce de loup étudiée, *Canis lupus italicus* (Randi et al. 2000), est protégée. Il n'est présent qu'en Italie et dans les zones récemment recolonisées des Alpes dans les pays voisins (Valière et al. 2003). Le loup n'a jamais disparu de l'Italie centrale, où de petits groupes d'individus ont survécu à l'extermination à grande échelle de l'espèce en Europe occidentale (Boitani 2003). Depuis la protection du carnivore dans les années 1970, la population recolonise le massif Alpin à partir des Apennins (Lucchini et al. 2002 ; Fabbri et al. 2007 ; Ciucci et al. 2009). En France, la première meute de loups s'est installée dans le parc national du Mercantour (PNM) en 1993, après plus de 50 ans d'absence (Houard et Lequette 1993).

La plupart des enquêtes sur la maladie du CPV-2, du CDV et du CECov utilisent des enquêtes sérologiques pour détecter des **anticorps spécifiques**. **Les anticorps indiquent une exposition antérieure à un agent infectieux mais ne fournissent pas d'informations sur l'infection actuelle**. Le virus disparaît rapidement des matières fécales une fois l'infection active terminée. En accord avec cela, une étude précédente au Canada a montré une séroprévalence de 100% des anticorps contre le CPV-2 chez les loups échantillonnés ($n = 18$), mais l'absence du virus dans tous les échantillons fécaux collectés dans la même population (Stronen et al. 2011). La recherche d'**ADN** du CPV-2 dans des échantillons de tissus a également donné des résultats négatifs lors d'une enquête à grande échelle sur des carnivores vivant en liberté, même si les anticorps détectés prouvaient une exposition antérieure au virus chez certains individus (Frölich et al. 2005).

Une enquête sérologique sur quatre loups capturés dans le centre de l'Italie en 1993 et 1994 a montré une exposition antérieure de quatre et un individus au CPV-2 et à la CDV respectivement, alors qu'aucune exposition au CECov n'a été détectée (Fico et al. 1996). Des résultats similaires ont été obtenus chez des ours captifs et en liberté dans le parc national d'Abruzzo, Lazio e Molise (PNALM) entre 1991 et 1995 (Marsilio et al. 1997). **Une étude approfondie menée dans le nord de l'Italie en 1994 et 1995 a signalé la présence du CPV-2 dans 3,5% des excréments de loups analysés** (Martinello et al. 1997). Un grave foyer de CDV s'est récemment propagé dans une partie de l'Europe (Sekulin et al. 2011 ; Origgi et al. 2012). **En Italie, le foyer a été détecté pour la première fois dans le nord du pays en 2006 et s'est rapidement étendu vers le sud** (Monne et al. 2011). En Italie centrale, y compris tout autour de la zone du PNALM, la mort de 20 loups a récemment été attribuée à une infection par la CDV ; cinq de ces animaux étaient également infectés par le CPV-2 (Di Sabatino et al. 2014). Dans le PNM, une étude a recherché la présence du CPV-2 dans la population de loups en 1996 et 1997, mais n'a pas pu donner de preuves concluantes de la présence du virus (Rossi 2000). À notre connaissance, aucune autre enquête à grande échelle sur les maladies virales n'a été menée sur cette sous-espèce de loup. En Italie, des taux élevés de **séroprévalence** du CPV-2, du CDV et du CECov ont été récemment rapportés dans des populations de chiens domestiques (Priestnall et al. 2007) et en liberté (Corrain et al. 2007). Spiss et al. (2012) ont récemment montré une séroprévalence élevée du CECov dans une étude à grande échelle de chiens domestiques en Autriche.

L'émergence de variants très contagieux et hautement virulents de ces virus en Europe occidentale souligne le rôle crucial des enquêtes sur les loups dans les zones concernées. L'identification des agents pathogènes potentiellement dangereux dans les populations sensibles est une première étape importante pour évaluer et atténuer leur impact potentiel sur la dynamique des populations d'animaux vivant en liberté (Murray et al. 1999). Comprendre quels facteurs écologiques déterminent la propagation et la gravité des maladies peut aider à contrôler l'impact des infections sur les populations hôtes (Murray et al. 1999). Les objectifs de notre étude étaient (a) d'étudier l'occurrence et la distribution spatiale des infections par le CPV-2, la CDV et le CECov chez les loups du PNALM (Italie) et du PNM (France) et (b) de rechercher les corrélats environnementaux de l'infection afin d'aider à comprendre et à atténuer la propagation des maladies. Nous nous attendions à ce que les virus soient moins répandus dans la population de loups du PNM en raison de son origine plus récente, de sa plus faible densité et/ou de la plus faible densité et distribution spatiale d'autres hôtes sympatriques sensibles.

MATERIEL ET METHODES

Zones d'étude

Nous avons mené cette étude sur les loups dans le parc national d'Abruzzo, Lazio e Molise (PNALM), dans le centre de l'Italie, et dans le parc national du Mercantour (PNM), dans le sud-est de la France. Les populations de loups de ces deux zones d'étude sont reliées par un **couloir de dispersion** (Fig. 1). Les deux zones d'étude sont montagneuses, partiellement boisées et situées à des latitudes similaires (Tableau 1). Le bétail et différentes espèces d'ongulés sauvages sont présents toute l'année dans les deux parcs nationaux. Les principales espèces-proies des loups varient en fonction de l'abondance et de l'accessibilité des espèces d'ongulés présentes sur le territoire de chaque meute.

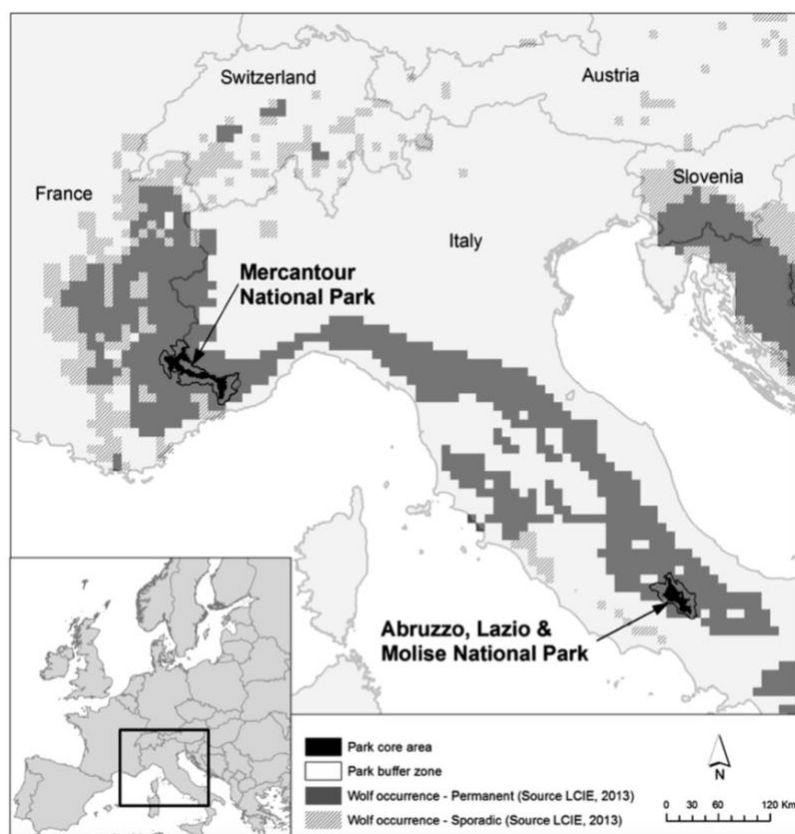


Fig. 1 Distribution des aires d'étude et des loups en 2012, montrant le couloir de dispersion entre l'Italie et la France redessiné à partir de Kaczensky et al. (2013)

Tableau 1 Caractéristiques des zones d'étude

Study area (winter)	Park creation year	Location (coordinates)	Mountain range	Wolf presence/ return ^a	Wolf density in studied winter (ind./1,000 km ²)
PNALM (2006–2007)	1923	Central Italy (41°76' N; 13°84' E)	Apennines	Always present	40–50 ^b
PNM (2005–2006)	1979	South-eastern France (44°18' N; 7°05' E)	Alps	Since 1992	11.5 ^c

PNALM Parc national des Abruzzes, du Lazio et du Molise, Italie, PNM Parc national du Mercantour, France, individus ind.

^a Houard et Lequette 1993 ; Boitani 2003

^b Valeurs minimales estimées (Ciucci et Boitani 2006, 2007)

^c La densité de loups a été calculée comme le nombre moyen de loups par meute divisé par la taille moyenne estimée du territoire des meutes dans le parc (taille estimée du territoire : 260-350 km², ONCFS Réseau Loup/Lynx 2006 ; Duchamp et al. 2012)

Le parc national du Mercantour est une zone qui n'a été recolonisée que récemment par les loups. Dans le PNM, la densité de la population de loups est faible par rapport au PNALM, d'où le carnivore n'a jamais disparu. En outre, les zones étudiées diffèrent par la présence, la densité et/ou la distribution spatiale d'autres carnivores susceptibles d'être infectés par les virus étudiés : les ours bruns (*Ursus arctos*) sont présents dans le PNALM mais absents du PNM, et les chiens sont répandus et très communs dans la région des Abruzzes (Boitani et Ciucci 1995 ; Boitani et al. 2002 ; Ciucci pers. com.) alors qu'ils sont rares et surtout localisés dans des zones restreintes (autour des villages) dans le PNM. Dans le PNALM, une population de chiens en liberté est bien établie dans et autour du parc. Les chiens de berger et les chiens de protection du bétail sont présents dans les deux zones d'étude, surtout en été. La plupart des chiens sont vaccinés dans le PNM (Luddeni, com. pers.), mais pas dans le PNALM (Ciucci, com. pers.).

Meutes étudiées

Nous avons examiné la distribution spatiale des virus par l'échantillonnage de différentes meutes dans chaque parc national, en considérant \geq deux loups voyageant ensemble comme une meute. Au moment du travail de terrain, sept meutes étaient connues pour avoir au moins une partie de leur domaine vital dans les limites de la zone tampon du PNALM et du PNM (MEEDEM et MAP 2008 ; Grottoli 2011). Sur la base de la qualité et de la quantité des échantillons fécaux collectés, nous avons retenu quatre meutes dans chaque parc national pour notre étude (Tableau 2). Le nombre d'animaux présents dans chaque meute étudiée a été évalué par des sessions de pistage dans la neige menées en hiver, complétées dans le PNM par des analyses génétiques (Duchamp et al. 2012). En été, des séances de hurlements de loups ont fourni des données sur le succès reproductif de ces meutes (Ciucci et Boitani 2006, 2007 ; Grottoli 2011 ; Duchamp et al. 2012). Les échantillons ayant été collectés en hiver, ils provenaient d'individus âgés de plus de 6 mois.

De plus, nous avons analysé cinq échantillons provenant d'individus qui se sont dispersés, sont morts ou n'ont pas pu être assignés à l'une des meutes du PNM, comme l'indique l'analyse génétique des échantillons fécaux collectés (voir Miquel et al. 2006 ; Duchamp et al. 2012 pour plus de détails). Deux de ces échantillons proviennent du même individu.

Collecte et identification des échantillons

Dans les deux zones d'étude, les excréments de loups ont été collectés tout au long de l'année par des scientifiques, des collaborateurs locaux et des gardes forestiers (Ciucci et Boitani 2006, 2007 ; Grottoli 2011 ; Duchamp et al. 2012) dans le but de réaliser un suivi moléculaire non invasif ou une analyse du régime alimentaire. Dans la présente étude, nous avons considéré les échantillons collectés entre le 1^{er} octobre 2005 et le 31 mars 2006 dans le PNM, et entre le 1^{er} octobre 2006 et

le 31 mars 2007 dans le PNALM. Dans les deux zones d'étude, la plupart des excréments de loups ont été collectés lors du suivi de la neige des meutes étudiées. En l'absence de couverture neigeuse, les échantillons ont été collectés à des postes d'odeur connus, à des carcasses exploitées ou lors d'enquêtes opportunistes le long des sentiers (Grottoli 2011 ; Duchamp et al. 2012).

Tableau 2 Caractéristiques écologiques des packs étudiés dans le PNALM (Parc national des Abruzzes, du Latium et de Molise, Italie) et le PNM (Parc national du Mercantour, France)

Study area and packs	Detected repr. in S_{t-1} ^a	Individuals/pack in W_t ^b	Detected repr. in S_t ^c	Individuals/pack in W_{t+1} ^d
PNALM (year)	(2006)	(2006–2007)	(2007)	(2007–2008)
Iorio	Yes	6	Yes	4
Mainarde	Yes	9	Yes	5
Orsara	Yes	3	Yes	6
Villavalelonga	Yes	7	Yes	6
Total		25		21
PNM (year)	(2005)	(2005–2006)	(2006)	(2006–2007)
Haute Tinée	Yes	3–4	No	2–4
Moyenne Tinée	No	2–3	No	2
Vésubie-Roya	No	3–5	Yes	4–5
Vésubie-Tinée	Yes	3–5	Yes	3–5
Total		11–17		11–14

Repr reproduction, W_t hiver du prélèvement d'échantillons, S_t été suivant le prélèvement d'échantillons

^{a, c} Présence détectée de petits pendant l'été précédant le prélèvement d'échantillons (S_{t-1}) et pendant l'été suivant le prélèvement d'échantillons (S_t ; ONCFS Réseau Loup/Lynx 2005, 2007 ; Grottoli 2011).

^{b, d} Taille de la meute pendant l'hiver du prélèvement d'échantillons (W_t) et pendant l'hiver suivant celui du prélèvement d'échantillons (W_{t+1}). Les estimations de la taille des meutes sont basées sur des sessions de suivi de la neige dans le PNALM (Ciucci et Boitani 2007, 2008 ; Grottoli 2011), et sur des sessions de suivi de la neige et des analyses génétiques effectuées sur des échantillons fécaux dans le PNM (ONCFS Réseau Loup/Lynx 2006, 2007 ; Duchamp et al. 2012)

Dans le PNALM, de multiples critères ont été utilisés pour discriminer de manière conservatrice les excréments de loups de ceux d'autres espèces, parmi lesquels un diamètre $\geq 2,5$ cm et un volume estimé ≥ 100 cc (Ciucci et Boitani 1998 ; Grottoli 2011). Sur la base des marqueurs ADNmt et nucléaires (Boggiano et al. 2013), toutes les crottes fraîches ($n = 107$) collectées sur la neige le long des trajectoires des loups de décembre 2005 à mars 2006 dans cette zone d'étude provenaient de loups, à l'exception de deux échantillons provenant de renards. Cela fournit une validation directe (98% de précision) des critères de sélection adoptés (Ciucci pers. com.).

Dans le PNM, des données génétiques basées sur un ensemble de sept loci microsattellites étaient disponibles à partir d'études pilotes antérieures en France. Ces données ont permis de distinguer les excréments de loups de ceux d'autres espèces (Valière et al. 2003) et d'identifier le sexe et l'identité de la plupart des animaux contributeurs par la détection de génotypes individuels à partir d'échantillons fécaux (voir Miquel et al. 2006 ; Duchamp et al. 2012 pour plus de détails).

Nous n'avons analysé que des échantillons bien conservés. Nous n'avons pas retenu pour analyse les échantillons fécaux partiellement consommés par les oiseaux, desséchés, ou exposés à la pluie ou à des températures manifestement supérieures au point de congélation. Nous avons exclu les échantillons composés principalement de poils (estimés à $> 90\%$ du volume des excréments), ainsi que les excréments sur-marqués d'urine ou se trouvant à moins de 50 cm d'un autre excrément. Le jour de la collecte, tous les échantillons ont été stockés à -20°C dans des sacs en plastique étiquetés et conservés congelés jusqu'à leur analyse.

Tableau 3 Détection des acides nucléiques du VCP-2, du CDV et du CECoV dans les crottes de loups provenant des meutes étudiées dans le PNALM (parc national des Abruzzes, du Latium et de Molise, Italie) et le PNM (parc national du Mercantour, France)

National parks and investigated packs/individuals	CPV-2			CDV	CECoV			N
	N _{Pos}	P	CI		N _{Pos}	N _{Pos}	P	
PNALM (2006–2007)	12	15.2	(7.0–23.4)	0	7	8.9	(2.6–15.2)	79
Iorio	3			0	0			13
Mainarde	4			0	3			27
Orsara	2			0	0			19
Villavalelonga	3			0	4			20
PNM (2005–2006)	8	12.1	(4.2–20.0)	0	4	6.1	(0.3–11.9)	66
Haute Tinée	7			0	1			18
Moyenne Tinée	0			0	0			12
Vésubie-Roya	0			0	0			10
Vésubie-Tinée	1			0	0			21
Dispersed/died/unidentified ^a	0			0	3 ^b			5
Total	20			0	11			145

Les résultats positifs (N_{Pos}) sont illustrés, ainsi que la prévalence (P) de chaque virus dans chaque zone d'étude et les intervalles de confiance (CI) à 95% correspondants. P et CI sont exprimés en pourcentages (%). N : nombre total d'échantillons fécaux analysés.

CPV-2 = parvovirus canin de type 2, CDV = virus de la maladie de Carré, CECoV = coronavirus entériques canins.

^a Échantillons provenant d'individus qui se sont dispersés, qui sont morts ou qui n'étaient pas assignables à l'une des meutes du PNM, comme l'indiquent les analyses génétiques de l'ADN

^b Deux des trois échantillons positifs proviennent d'un seul individu, comme l'indiquent les données génétiques obtenues par l'analyse des échantillons fécaux collectés (voir Miquel et al. 2006 et Duchamp et al. 2012 pour plus de détails).

Dépistage des acides nucléiques et analyse des séquences

Pour évaluer l'infection effective par les virus, et pas seulement l'exposition des individus, nous avons criblé les excréments collectés à la recherche de séquences spécifiques d'acides nucléiques viraux. Avant l'extraction des acides nucléiques, les échantillons ont été soumis à un vortex pendant 1 min et centrifugés à 4 000 × g pendant 10 min ; 140 µl ont servi de matrice à l'aide d'un kit disponible dans le commerce (QIAamp viral RNA Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne, adapté pour extraire l'ARN viral ainsi que l'ADN) en suivant les instructions du fabricant. Les extraits ont été conservés à -80°C.

La détection de l'ARN spécifique du CDV a été effectuée avec les amorces PP-I p1 et p2 décrites par Frisk et al. (1999). Les analyses RT-PCR ont été réalisées dans un volume de 20 µl (18,4 µl de mélange réactionnel, kit OneStep RT-PCR, Qiagen ; 1,6 µl de matrice) et une concentration d'amorces de 0,4 µM. Le schéma du thermocycleur comprenait deux étapes de pré-PCR de 50°C, 30 min et 94°C, 15 min, suivies de 40 cycles de dénaturation (94°C, 30 s), d'hybridation (58°C, 30 s) et d'extension (72°C, 1 min) et d'une extension finale (72°C, 10 min). Pour la détection des acides nucléiques spécifiques du CECoV (membre du genre *Alphacoronavirus*), une PCR en temps réel a été réalisée en utilisant les amorces et la sonde décrites par Gut et al. (1999), qui indiquent une forte réactivité croisée entre les *Alphacoronavirus*. Les acides nucléiques spécifiques du parvovirus canin de type 2 ont été détectés par realtime-PCR avec les amorces et la sonde décrites par Decaro et al. (2005). Des contrôles négatifs, constitués uniquement des composants du kit, ont été réalisés avec les échantillons à toutes les étapes de la procédure. Les résultats équivoques n'ont pas été pris en compte dans l'interprétation des données.

Le séquençage a été réalisé sur 409 pb du gène CCoV (amorces CCoV1 et CCoV2 selon Pratelli et al. 2002) et 683 pb du gène CPV-2 (amorces F/CPV-2F : 5'-ATGG AGCAGTTCAACCAGAC-

3' et F/CPV-2R : 5'-TGTTGG TGTGCCACTAGTTC-3'). L'ADN amplifié a été extrait à l'aide d'un kit disponible dans le commerce (QIAquick® PCR purification kit) en suivant les instructions du fabricant et a servi de matrice pour la PCR de séquençage, qui a été réalisée dans un volume de 20 µl avec un mélange de PCR de séquençage prêt à l'emploi (DNA Sequencing Kit). Les séquences avant et arrière des produits de la PCR ont été analysées à l'aide de l'analyseur génétique ABI Prism 310.

Prévalence et intervalle de confiance

La prévalence est exprimée en N_{Pos}/N , N_{Pos} étant le nombre d'excréments de loups dans lesquels des acides nucléiques du CPV-2, du CDV ou du CECoV ont été détectés, et N le nombre total d'échantillons analysés pour le virus considéré dans chaque zone d'étude. Comme toutes les crottes ne sont pas statistiquement indépendantes (c'est-à-dire que plusieurs échantillons fécaux analysés proviennent des mêmes individus), la prévalence calculée ne représente pas la prévalence du virus dans les populations et ne peut être interprétée comme telle. Cependant, nous avons utilisé ces valeurs pour une simple comparaison des zones d'étude. Nous avons calculé les intervalles de confiance (95%) en suivant une distribution binomiale pour les grands échantillons (Sokal et Rohlf 1995), en utilisant R 2.15 (R Core Team 2013).

RESULTATS

Nous avons analysé 79 échantillons fécaux de loups du PNALM et 66 du PNM, collectés auprès de quatre meutes dans chaque zone d'étude (Tableau 3). Dans le PNM, nous avons également analysé cinq échantillons provenant d'individus qui n'ont pas pu être assignés à une meute, se sont dispersés ou sont morts. Afin de confirmer la spécificité, nous avons analysé des séquences choisies au hasard dans cinq échantillons positifs pour le CPV-2 et deux pour le CECoV. L'homologie entre les cinq séquences de CPV-2 était de 99,5 à 100% et de 99 à 99,3% avec la souche CPV-2 C-780916 (American Type Culture Collection ATCC VR-953). Les séquences des deux échantillons positifs au CECoV présentaient jusqu'à 98-99% d'homologie avec diverses séquences de CECoV disponibles dans la GenBank (EU856361.1, DQ112226.1, EU924791.1 et EU924790.1).

Nous avons identifié le CPV-2 dans les quatre meutes du PNALM ($n = 12$, prévalence = 15,2%) et dans deux meutes différentes du PNM ($n = 8$, prévalence = 12,1% ; Tableau 3). Dans le PNM, tous les échantillons positifs sauf un provenaient de la meute de la Haute Tinée, dans laquelle les deux femelles et le seul mâle ont tous excrété de l'ADN du CPV-2 dans leurs fèces. Un autre échantillon positif provenait d'un mâle de la meute de la Vésubie-Tinée. Nous avons détecté le CECoV dans deux meutes du PNALM ($n = 7$, prévalence = 8,9%) et une meute ainsi que deux autres individus du PNM ($n = 4$, prévalence = 6,1%). Dans le PNM, les échantillons positifs des individus identifiés provenaient de la meute de Haute Tinée ($n = 1$) et d'un mâle disperseur ($n = 2$). Nous n'avons pas détecté d'acides nucléiques de la CDV dans les échantillons analysés.

Nous avons détecté à la fois le CPV-2 et le CECoV dans deux échantillons provenant de la meute Italienne de Villavalelonga. En considérant les infections au niveau de la meute, nous avons détecté à la fois le CPV-2 et le CECoV dans deux meutes du PNALM et dans une meute du PNM (Tableau 3).

DISCUSSION

La présente étude est la première enquête à grande échelle sur les infections multivirales menée sur les loups en Italie ou en France par des techniques non invasives et fait partie des rares enquêtes sur les loups en Europe occidentale (Martinello et al. 1997 ; Sobrino et al. 2008 ; Santos et al. 2009 ; Di Sabatino et al. 2014). **A notre connaissance, nos résultats sont les premières infections CECoV (Coronavirus entérique canin) rapportées chez des loups en dehors de l'Alaska.** Bien que l'exposition des loups au CPV-2 (Parvovirus canin) ait été précédemment rapportée en France (sur la base de quelques nécropsies opportunistes d'animaux morts ; Duchamp et Gauthier, données non publiées) et en Italie (Fico et al. 1996 ; Martinello et al. 1997 ; Di Sabatino et al. 2014), notre étude fournit la première preuve concluante d'une infection par le CPV-2 dans plusieurs meutes de loups établies dans ces deux pays. Des tests opportunistes antérieurs sur des animaux trouvés morts n'ont révélé aucune infection par le CDV (Maladie de carré) ou le CECoV chez les loups français, alors que des enquêtes similaires ont récemment détecté la CDV chez des loups autour du PNALM (Di Sabatino et al. 2014). Étant donné l'impact négatif possible de ces virus sur les populations de canidés, et parce que seulement peu d'informations sont disponibles sur *C. lupus italicus*, les résultats de notre étude sont importants pour la gestion de la conservation et soulignent la nécessité d'une surveillance continue.

Nous avons utilisé des **investigations moléculaires** pour détecter les acides nucléiques viraux dans les échantillons fécaux des PNM et PNALM. Alors que cette technique est incapable de détecter une exposition antérieure, comme l'indiquent les anticorps antiviraux spécifiques, elle permet de détecter une infection récente des individus (Martinello et al. 1997 ; Murray et al. 1999). Les mêmes techniques moléculaires ont été utilisées pour chaque virus et les analyses ont été effectuées dans un seul laboratoire, ce qui garantit la cohérence des résultats et permet ainsi une comparaison directe des deux populations étudiées. Comme la plupart des études précédentes ont étudié l'exposition aux virus par le biais d'enquêtes sérologiques, les résultats dérivés ne peuvent être directement comparés à nos résultats.

Le contact physique étroit entre les membres d'un groupe est caractéristique des canidés sociaux tels que les loups et favorise grandement la transmission d'agents pathogènes au sein de la meute (Johnson et al. 1994). Les membres de la meute utilisent régulièrement l'urine et les fèces pour marquer leur territoire (Harrington et Asa 2003) et l'inspection des marques fécales est fréquente le long des limites du territoire. L'examen de la zone ano-génitale des congénères fait partie des interactions sociales courantes (Harrington et Asa 2003). Ces caractéristiques comportementales des loups favorisent la transmission oro-fécale d'agents pathogènes entre individus. Par conséquent, et étant donné que ces virus sont **hautement contagieux**, la détection du CPV-2 ou du CECoV dans un ou plusieurs échantillons provenant d'une meute suggère que plusieurs membres de cette meute étaient probablement infectés. **Ainsi, nous discutons nos résultats principalement sur la base de l'infection au niveau de la meute.**

Les populations de loups du PNALM et du PNM sont reliées par un couloir de dispersion (Ciucci et al. 2009 ; Falcucci et al. 2013) depuis plus de 20 ans, et la région séparant les deux zones d'étude abrite plusieurs espèces **hôtes alternatives** sensibles largement distribuées (par exemple le renard roux - *Vulpes vulpes*). Par conséquent, on pourrait s'attendre à des taux d'infection similaires des loups par les virus étudiés, hautement contagieux, dans les deux zones. Cependant, les différences entre le PNALM et le PNM en ce qui concerne la densité des loups ainsi que la présence et la

densité d'autres espèces hôtes sensibles peuvent être des facteurs écologiques importants qui déterminent la distribution des virus dans l'environnement et, par conséquent, l'exposition des loups à ces agents pathogènes. En particulier, la distribution spatiale des chiens, répandue dans le PNALM alors qu'elle est plus **localisée** dans le PNM, peut jouer un rôle spécifique dans la transmission des maladies aux loups. Dans le PNALM, une population de chiens libres non vaccinés vit en sympatrie avec les meutes de loups étudiées. Dans la région du Mercantour, de nombreux chiens de ferme et de chasse sont déclarés séropositifs au CPV-2, selon les vétérinaires locaux (Luddeni, com. pers.). Ceci peut cependant être la conséquence d'une vaccination ou d'une exposition au virus dans l'environnement. Parmi les quatre meutes Françaises étudiées, le territoire de la meute de Haute Tinée est le seul à contenir un village important en son centre, ce qui peut augmenter les taux de contact entre les loups et les fèces contaminées des chiens domestiques. **Le territoire de cette meute se trouve également le long d'une des principales routes traversant les Alpes, et est utilisé par de nombreux voyageurs et leurs chiens de compagnie.** Ces importantes influences anthropogéniques agissant dans cette zone spécifique peuvent favoriser la transmission d'agents pathogènes vers les loups par la contamination de l'environnement par les chiens domestiques, et pourraient expliquer la détection du CPV-2 et du CECoV dans la meute de Haute Tinée.

Parvovirus canin de type 2

La prévalence du CPV-2 dans les échantillons fécaux de loups varie de 12,1% à 15,2% dans le PNM et le PNALM respectivement. L'identification du CPV-2 dans toutes les meutes étudiées du PNALM suggère que le virus est enzootique dans cette population de loups (Almberg et al. 2009 ; Mech et Goyal 2011). **Dans le PNM, cependant, le CPV-2 n'a été détecté que dans deux meutes sur quatre**, ce qui indique que le virus n'est peut-être pas encore établi dans l'ensemble de la population.

Bien que la densité des diverses espèces susceptibles d'être infectées par le CPV-2 puisse être similaire dans les deux zones d'étude, la population de chiens en liberté présente uniquement dans le PNALM peut jouer un rôle important dans la dissémination du CPV-2 dans l'environnement. Les ours bruns sont également absents du PNM, alors que des individus infectés par le CPV-2 ont été signalés dans le PNALM (Marsilio et al. 1997). Ainsi, même si le CPV-2 est **hautement résistant** (Steinel et al. 2001), la contamination de l'environnement par le virus peut être limitée dans le PNM en raison d'une densité et/ou d'une aire de distribution d'autres hôtes sensibles plus faibles que dans le PNALM.

Coronavirus entériques porcins

Le groupe des *Alphacoronavirus* (ACVs) comprenant les coronavirus entériques porcins (Decaro et Buonavoglia 2008), la détection, dans notre étude, d'ACVs provenant de sangliers infectés consommés par les loups ne peut être exclue. En effet, ces ongulés sont des espèces proies du carnivore dans le PNALM (Grottoli 2011) et dans le PNM. Cependant, seule une très faible prévalence d'infection par les ACV est rapportée chez les sangliers en Europe (Vengust et al. 2006 ; Ruiz-Fons et al. 2008 ; Sedlak et al. 2008 ; Kaden et al. 2009), et la dilution des particules virales dans les fèces des loups diminuerait encore les chances de détection. De plus, notre séquençage d'échantillons positifs sélectionnés au hasard dans le PNALM et le PNM a indiqué une spécificité pour le CECoV.

La forte densité de populations d'hôtes sensibles (Zarnke et al. 2001) et les interactions sociales fréquentes avec des congénères (Priestnall et al. 2007) augmentent les possibilités de transmission du CECoV. Nous avons identifié ce virus dans deux meutes du PNALM et une meute du PNM. Le fait que le CECoV n'ait pas été détecté dans toutes les meutes suggère que le virus n'est pas enzootique dans ces populations de loups. Les coronavirus sont inactivés en quelques jours à 37°C, mais restent infectieux pendant plusieurs mois à 4°C ou moins (Pratelli 2008). Dans leur étude sérologique d'une population de loups, Zarnke et al. (2001) ont signalé que le CECoV pouvait être transmis principalement en hiver. Ils ont également montré que l'immunité contre le CECoV semble être de courte durée et disparaît rapidement sans ré-exposition au virus. Par conséquent, nos résultats suggèrent que le CECoV est mieux maintenu dans les populations multi-hôtes à haute densité du PNALM et/ou que le virus est introduit de façon récurrente dans la population de loups par des hôtes sensibles sympatriques. En Italie, l'exposition des chiens au CECoV est largement répandue et fréquemment rapportée (Pratelli et al. 2003 ; Priestnall et al. 2007 ; Decaro et Buonavoglia 2008 ; Decaro et al. 2008). Ainsi, la population de chiens en liberté du PNALM pourrait servir de réservoir pour l'infection ou la réinfection des loups par ce virus.

Co-infection par le CPV-2 et le CECoV

La co-infection par le CPV-2 et le CECoV est connue pour augmenter la sévérité des symptômes (Evermann et al. 2005 ; Decaro et al. 2006 ; Pratelli 2006), et des cas mortels ont été rapportés chez des chiots de chiens (Decaro et al. 2006). Dans le PNALM, nous avons détecté à la fois le CECoV et le CPV-2 dans deux meutes et trouvé une infection simultanée par les deux virus dans les échantillons collectés dans l'une d'elles. Dans les meutes Italiennes, la mortalité des jeunes louveteaux généralement causée par la co-infection par le CPV-2 et le CECoV n'a cependant pas entraîné la perte précoce de portées entières. Une fois que le CPV-2 devient enzootique dans une population, son impact négatif sur la survie des louveteaux semble diminuer (Mech et Goyal 2011). Le développement d'une **immunité durable**, voire à vie, suite à l'infection par le CPV-2 (Steinel et al. 2001 ; Mech et Goyal 2011) peut avoir un **effet protecteur** sur la population de loups du PNALM, et contribuer à expliquer le succès reproductif des quatre meutes, malgré la détection du CPV-2 et du CECoV dans deux d'entre elles. Dans le PNM, nous avons trouvé à la fois le CECoV et le CPV-2 uniquement dans la meute de la Haute Tinée, aucun échantillon ne contenant les deux virus. Il est possible que la co-infection fatale avec le CPV-2 et le CECoV puisse être un facteur déterminant expliquant l'absence de louveteaux survivants dans la meute de la Haute Tinée au cours de l'été suivant celui de la collecte des échantillons. Cependant, nous savons aussi qu'un des partenaires d'accouplement a disparu de la meute pendant l'hiver de l'enquête. Malgré la détection ultérieure d'un nouvel individu dans cette meute avant le début de la saison des accouplements, il n'est pas clair si ce nouveau membre de la meute a remplacé le partenaire manquant.

Comme nos résultats suggèrent que le CPV-2 n'est pas enzootique dans la population de loups du PNM, les individus peuvent être plus vulnérables à l'infection par le CPV-2 ainsi qu'à la co-infection par le CPV-2 et le CECoV. Ceci peut avoir contribué à la faible production de petits détectés pendant deux étés consécutifs dans le PNM (2005 et 2006) par rapport au PNALM (2006 et 2007).

Le virus de la maladie de Carré

Des enquêtes sérologiques menées il y a 15 ans ont rapporté une exposition à la CDV chez trois ours bruns sur neuf en liberté (Marsilio et al. 1997) dans le PNALM, et chez un loup sur quatre dans une zone géographique voisine (Fico et al. 1996). L'exposition des renards et des blaireaux à la CDV a également été documentée dans la même zone générale (Di Sabatino et al. 2014). Comme

aucun des échantillons que nous avons analysés n'a été testé positif à la CDV, nos résultats suggèrent que le virus était absent des populations de loups étudiées au moment de la collecte des échantillons. Cependant, le fait que les individus infectés n'excrètent généralement le virus que pendant 4 à 5 jours dans leurs fèces minimise les chances de détecter l'agent pathogène, même chez les animaux malades.

Implications générales

L'impact négatif des maladies sur la dynamique des populations est sous-estimé, car la **morbidité** et la mortalité sont difficiles à évaluer dans les populations en liberté (Zarnke et al. 2004). Cela s'applique encore plus aux grands carnivores, en raison de leur comportement secret (Murray et al. 1999). **L'ampleur de l'impact dépend des proportions de mortalités additives et compensatoires causées par les maladies.** Chez les espèces sociales telles que les loups, la mortalité causée par les infections peut cependant aussi affecter d'autres paramètres biologiques importants, comme la structure sociale des groupes.

L'infection par l'un ou l'autre des virus considérés dans la présente étude peut avoir des effets considérables sur la dynamique des populations de canidés sensibles par une augmentation de la mortalité et/ou une diminution de l'état de santé général, et par conséquent avoir un impact sur la dispersion des populations en liberté (Johnson et al. 1994 ; Kreeger 2003 ; Pratelli 2006 ; Almborg et al. 2009 ; Nandi et Kumar 2010 ; Mech et Goyal 2011 ; Monne et al. 2011 ; Prager et al. 2012). Les enquêtes à grande échelle sur les maladies sont encore rarement entreprises chez les carnivores sauvages Européens. La mortalité et la **morbidité** induites par les maladies dans la population de loups du PNALM, établie depuis longtemps et saturée, peuvent avoir des conséquences à plus grande échelle, en ralentissant la dynamique de dispersion de l'espèce et en affectant ainsi directement les populations connectées et en expansion.

Nos résultats indiquent que le CECoV devrait être largement inclus dans les enquêtes épidémiologiques chez les canidés en liberté. **Étant donné que le CECoV reste infectieux pendant de longues périodes à des températures froides (Pratelli 2008), ce virus pourrait représenter un problème de conservation plus important dans les écosystèmes boréaux et/ou de montagne connaissant des conditions hivernales annuelles.** En Europe, cela s'applique à la plupart des pays nordiques et aux zones montagneuses situées à des altitudes plus élevées, comme les Alpes et les Apennins.

À l'avenir, les contacts entre les grands carnivores et les animaux domestiques, et donc les risques de transmission de maladies infectieuses, vont probablement augmenter en raison du chevauchement des aires de répartition (Murray et al. 1999) résultant de la fragmentation de l'habitat (Cleaveland et al. 2002). Les agents pathogènes infectant plusieurs taxons et ceux qui sont hautement contagieux seront les plus préoccupants en matière de conservation (Murray et al. 1999). Les canidés sauvages présentent un risque spécifique d'exposition aux maladies, car ils partagent avec le chien, le carnivore le plus abondant, une sensibilité à de nombreux agents pathogènes (Randall et al. 2004). Entre autres, il a été suggéré que les chiens pourraient être un réservoir pour l'infection des canidés sauvages par le CPV-2, le CECoV et la CDV (Corrain et al. 2007 ; Prager et al. 2012 ; Di Sabatino et al. 2014). Cela pourrait également être le cas pour les infections par le CPV-2 et le CECoV chez les loups du PNALM et du PNM. **En effet, en comparant nos deux zones d'étude, la prévalence globale du CPV-2 et du CECoV est similaire, mais la distribution spatiale de l'infection dans les meutes diffère : elle est cohérente avec la présence des chiens, largement distribuée dans le PNALM alors qu'elle est plus localisée autour des villages dans le PNM.** La grande population de chiens libres non vaccinés présente en Italie (Verardi et al. 2006 ; Corrain et al. 2007) augmente considérablement la densité **d'hôtes** sensibles, et peut donc avoir un

impact important sur la propagation et le maintien des pathogènes canidés dans l'environnement. Une étude de la population de chiens sauvages des Abruzzes, qui comprend le PNALM (Boitani et Ciucci 1995), soutient cette hypothèse. Elle rapporte un très faible taux de survie des louveteaux (30% et 7,5% à l'âge de 70 jours et de 4 mois, respectivement), et une démographie de la population essentiellement déterminée par des mécanismes stochastiques. Ces observations pourraient bien s'expliquer par une infection ou une co-infection par les virus considérés dans notre étude, et suggèrent que les chiens sympatriques pourraient jouer un rôle important dans l'infection des loups. Comme les renards et les chiens, les chacals sont susceptibles d'être infectés par des agents pathogènes canidés, dont le CECoV (Goller et al. 2012), et sont même signalés comme hôtes réservoirs du CPV-2 et de la CVD (Aguirre 2009). Comme le chacal doré (*Canis aureus*) étend son aire de répartition en Europe et a récemment atteint le nord de l'Italie (Arnold et al. 2012), cet hôte sensible supplémentaire pourrait jouer un rôle croissant dans la propagation des virus étudiés en Europe.

La collecte non invasive d'échantillons utilisée dans ce travail est bien adaptée à notre étude des populations de loups en liberté. De plus, les excréments collectés en hiver fournissent les données les plus représentatives, car les procédures de suivi de la neige permettent potentiellement d'accéder aux échantillons de chaque individu, indépendamment des caractéristiques du comportement de marquage des chefs de meute (Verardi et al. 2006).

CONCLUSION

Les agents pathogènes hautement contagieux ayant un potentiel important de transmission horizontale seront une préoccupation croissante pour la conservation des carnivores. Nos résultats suggèrent que le CPV-2 est enzootique dans la population de loups du PNALM mais pas dans le PNM, et que le CECoV est épisodique dans les deux zones. Dans chaque zone d'étude, l'infection détectée dans les meutes était cohérente avec la distribution spatiale des chiens, qui peuvent jouer un rôle important dans l'infection des loups. Nous recommandons donc vivement la vaccination des chiens domestiques et de travail, ainsi que des chiens errants, chaque fois que cela est possible. La population de loups récemment établie dans le PNM pourrait être plus vulnérable aux infections virales et moins résistante aux événements épizootiques que la population établie de longue date dans le PNALM. D'un autre côté, la population de loups de PNALM présente un risque accru d'exposition à des souches émergentes de virus hautement virulents, car la transmission est plus probable dans les populations multi-hôtes sensibles à forte densité. Les infections dans la population source de PNALM peuvent avoir un impact négatif direct sur les populations recolonisatrices connectées, en diminuant leur survie et leur dispersion. De futures enquêtes à grande échelle sur les maladies infectieuses, tant chez les loups que chez d'autres espèces sympatriques sensibles, aideraient à comprendre les schémas épidémiologiques et spatio-temporels des infections.

La prise en compte des maladies potentiellement nuisibles pourrait également affiner de manière importante la modélisation démographique des populations de grands carnivores en liberté et affiner notre compréhension de la dynamique des populations de ces espèces. Nos résultats suggèrent fortement que des enquêtes longitudinales prospectives à grande échelle sont essentielles pour surveiller et évaluer la propagation des virus, qu'il s'agisse de souches établies ou nouvelles, et leurs conséquences sur les populations étudiées. Ils soulignent la nécessité d'une surveillance continue des maladies virales et autres maladies infectieuses, dans les programmes de conservation et dans les stratégies de gestion locale et globale des loups et autres carnivores, comme une première étape importante pour tenter d'atténuer l'impact des infections sur les populations sauvages.