

Année 2007

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE PHYLOGÉNÉTIQUE
DES INFECTIONS À CORONAVIRUS CANIN ET FELIN**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRETEIL

le

par

Jeremy NUHAM

Né le 3 février 1982 à Champigny-sur-Marne (Val-de-Marne)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Mme Sophie LE PODER

Maître de conférences à l'ENVA

Assesseur : Mme Nadia HADDAD

Maître de conférences à l'ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, Maître de conférences	- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences
-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur	- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences
-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSE Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences	-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur
-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences	-DISCIPLINE : GENETIQUE MEDICALE ET CLINIQUE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mlle ABITBOL Marie, Maître de conférences
-UNITE : BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences	-DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur
	-DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHOLON Jean-Louis , Professeur

- UNITE DE MEDECINE M. POUCHOLON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel	- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mlle RAVARY Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel
- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel M. PICCOT-CREZOLLET Cyrille, Maître de conférences contractuel	- UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel
-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mlle LEDOUX Dorothée, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)	-UNITE D'OPHTALMOLOGIE M. CLERC Bernard, Professeur* Mlle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel
	- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel Mlle HALOS Lénaïg, Maître de conférences
	-UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences

-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences	- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*
-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences	- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences
- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences	

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier,

Monsieur le Professeur
de la faculté de médecine de Créteil,
qui a accepté la présidence de notre jury de Thèse.

Mme le Docteur LEPODER
de l'école nationale vétérinaire d'Alfort,
pour son encadrement, sa disponibilité et ses conseils nécessaires à l'élaboration de cette étude.

Mme le Docteur HADDAD,
de l'école nationale vétérinaire d'Alfort,
pour son écoute et ses conseils dans l'élaboration de cette étude.

M. le professeur ELOIT de m'avoir accueilli à l'UMR 1161 ainsi que toute l'équipe du laboratoire.

Mme DUARTE
technicienne de l'UMR, à l'école nationale vétérinaire d'Alfort,
pour sa participation, son soutien et sa disponibilité dans la réalisation des expériences de cette étude.

Mme le Docteur PAROUTAUD
de la SPA de Vaux le Pénil,
qui a accepté la réalisation des prélèvements sur les chiens et chats de la SPA.

Mes parents,
qui m'ont apporté leur soutien tout au long de la rédaction de la thèse et de mes études.

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION.....	7
PREMIERE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : ETUDE GENERALE DE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE.....	8
I. VIROLOGIE.....	9
1. Morphologie.....	9
2. Classification des <i>Coronavirus</i> félins.....	11
3. Propriétés physico-chimiques.....	12
4. Biologie.....	12
• Multiplication virale.....	12
• Antigénicité.....	13
• Franchissement de barrière d'espèce.....	14
II. LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE	15
1. Pathogénie.....	15
2. Epidémiologie.....	16
• Epidémiologie descriptive.....	16
• Epidémiologie analytique.....	17
• Epidémiologie synthétique.....	17
3. Symptômes.....	17
4. Lésions.....	19
5. Diagnostic.....	19
• Diagnostic différentiel.....	20
• Imagerie médicale.....	21
• Analyse du liquide d'épanchement.....	21
• Tests biochimiques sanguins.....	21

• Numération formule sanguine.....	21
• Histologie.....	22
• Sérologie.....	22
• Amplification du génome viral.....	23
• Algorithme décisionnel en cas de suspicion de PIF.....	24
6. Thérapeutique.....	25
7. Prophylaxie.....	25
8. Pronostic.....	26
9. Conclusions et Perspectives.....	26
 PRESENTATION DES DEUX PROJETS D'ETUDE.....	 27
 DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE.....	 29
 I. MATERIEL ET METHODES.....	 30
1. Les animaux.....	30
• Première étude sur le taux d'infections à <i>Coronavirus</i> chez les chats de particulier.....	30
• Deuxième étude sur la circulation de <i>Coronavirus</i> en collectivité.....	30
2. Les prélèvements.....	31
3. Méthode de titrage des anticorps anti-coronavirus par immunofluorescence indirecte.....	32
4. Techniques moléculaires.....	33
• Extraction des ARN viraux leucocytaires à partir de sang total.....	33
• Extraction des ARN viraux à partir d'écouvillons rectaux.....	33
• RT-PCR	33
• Clonage des gènes.....	36
• Séquençage et analyse phylogénétique.....	39

5. Tests statistiques.....	39
II. RESULTATS.....	40
1. Etude du taux d'infections à <i>Coronavirus</i> chez des chats de particuliers asymptomatiques.....	40
2. Etude de la circulation virale de <i>Coronavirus</i> entre des chiens et des chats en bonne santé en contact au sein d'une SPA.....	45
• Résultats des RT-PCR.....	47
o Séquence consensus.....	47
o Gènes M et N.....	48
▪ Gène M.....	49
▪ Gène N.....	50
• Résultats des clonages.....	52
• Résultats des analyses de séquence.....	53
o Pour le gène M.....	53
o Pour le gène N.....	55
Bilan	57
III. DISCUSSION.....	58
1. Etude des infections à <i>Coronavirus</i> chez les chats de particuliers dans une clinique de la région parisienne en 2004.....	58
2. Etude de la circulation virale au sein d'une SPA.....	59
CONCLUSION	61
BIBLIOGRAPHIE	62

INTRODUCTION

La Péritonite Infectieuse Féline (PIF) est une maladie virale mortelle des félidés due à un *Coronavirus*. En 1966 Wolfe et Griesmer mettent en évidence son étiologie infectieuse aux USA ; puis elle est décrite pour la première fois en Europe en 1968. Depuis des cas cliniques de PIF ont été enregistrés dans tous les pays européens et sur tous les continents (31).

Maladie assez rare, le problème se pose en élevage où parfois presque 100% de l'effectif a une sérologie positive ; parallèlement, elle est mortelle une fois déclarée et il n'existe à l'heure actuelle en France aucun vaccin efficace (27).

Cette maladie est difficile à appréhender cliniquement, vu son polymorphisme clinique et les difficultés d'interprétation du diagnostic sérologique. En effet la parenté est si proche entre le FIPV (virus de la péritonite infectieuse féline), agent causal de la PIF, et le FECV (*Coronavirus* entéritique félin), agent d'entérite bénigne chez le chat, qu'il est impossible de les différencier autant du point de vue sérologique que génétique ((7), (28) et (47)).

A défaut d'avoir résolu ce dernier problème, la RT-PCR permet dorénavant notamment d'étudier les différentes souches présentes sur le terrain et d'évaluer l'évolution de l'excrétion fécale et de la virémie ((3) et (21)). Nous nous sommes intéressés à la corrélation qu'il pourrait y avoir entre les résultats des différents tests chez des chats appartenant à des particuliers, chez qui la prévalence de l'infection aux *Coronavirus* est mal connue.

D'autre part, les *Coronavirus* forment un groupe dynamique, en ce sens que leur génome à ARN subit un fort taux de mutation qui explique leur capacité à franchir les barrières d'espèces. L'exemple du SRAS nous a montré que ce franchissement pouvait être à l'origine de l'apparition d'un nouveau variant hautement pathogène.

En ce qui concerne les *Coronavirus* du groupe 1, plusieurs données de la littérature sont en faveur d'une transmission interspécifique entre chiens et chats. Nous avons choisi dès lors d'étudier la circulation virale au sein d'un groupe de chiens et de chats en contact et vivant en milieu confiné, en nous intéressant à l'excrétion de *Coronavirus* dans leurs selles et au génotypage des virus trouvés. Notre objectif était d'apporter des arguments en faveur d'un éventuel franchissement de barrière d'espèce.

Dans une première partie nous présenteront les caractères généraux des *Coronavirus* ainsi que les différents aspects de la PIF. La seconde partie comportera deux études concernant l'épidémiologie de la PIF ; la première aura pour sujet l'étude du taux d'infections à *Coronavirus* chez les chats particuliers, asymptomatiques, dans une clinique de la région parisienne en 2004 ; la seconde traitera de la circulation virale au sein de la SPA de Vaux-le-Pénil entre des chiens et des chats vivant en promiscuité.

PREMIERE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

ETUDE GENERALE DE LA PERITONITE INFECTIEUSE FELINE

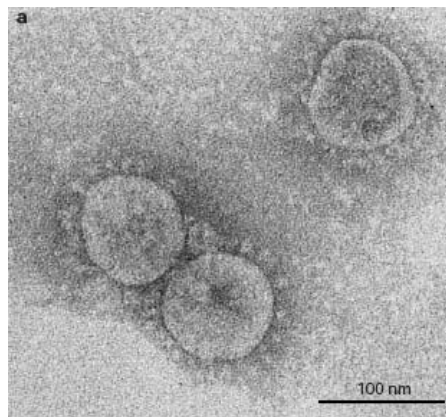
I. Virologie

La PIF est due à un virus de la famille des *Coronaviridae*, genre *Coronavirus*.

1. Morphologie

Les *Coronavirus* sont des particules virales sphériques, polymorphes et de taille très variable (60 à 200 nm) (32).

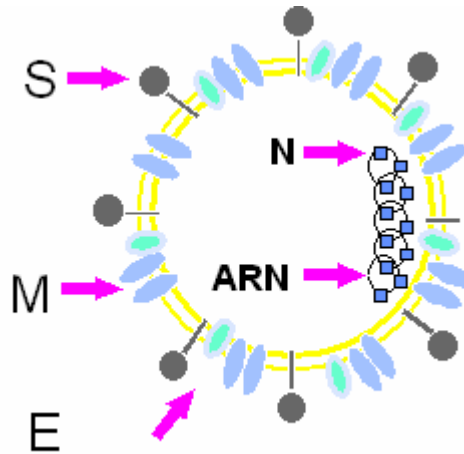
Figure 1 : Photo en microscopie électronique de *Coronavirus* infectant des cellules Véro (d'après (43))



Ce sont des virus enveloppés. Au sein de l'enveloppe (bicouche lipidique) sont enchâssées trois ou quatre protéines selon les groupes (voir figure 2) :

- la protéine S ou péplomère, glycosylée, donnant la forme caractéristique en couronne des *Coronavirus*, de poids moléculaire de 180 à 205 kDa ; elle est responsable de la fixation des virions aux récepteurs cellulaires, de l'induction de la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane de la cellule cible et de l'induction de la synthèse d'anticorps neutralisants (15) ;
- la protéine M (25 à 30kDa), glycosylée, nécessaire à la maturation des particules virales ; seuls 10% de la portion N-terminale se trouvent exposés à la surface des virions. Cette protéine comporte également trois hélices hydrophobes enchâssées dans l'enveloppe. La région C-terminale de la protéine comporte un domaine amphiphile associé à la face interne de la membrane ainsi qu'un segment hydrophile d'une quinzaine de résidus ((15) et (32)) ;
- la protéine E, polypeptide associé à la protéine M régulant l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales (15) ;
- la protéine HE, hémagglutinine estérase, présente chez la majorité des *Coronavirus* du groupe 2 (43).

Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'un Coronavirus du groupe 1 (d'après (15))



La protéine N dite de nucléocapside, de poids moléculaire 50 kDa, présente une forte affinité pour l'ARN ; elle prend part à la formation de la nucléocapside (15).

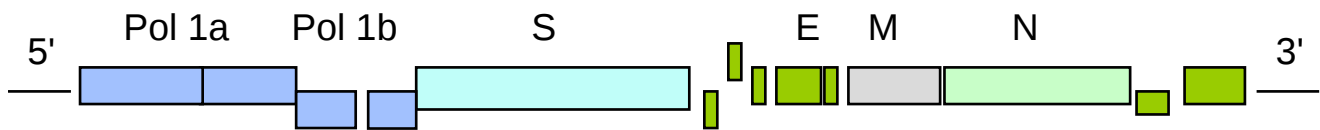
Le génome viral (figure 3) est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive associée à la protéine N (28).

Ce génome, de taille très élevée (30 000 paires de bases), possède deux régions non codantes principales : l'une en 5' de 200 nucléotides incluant la séquence « leader » indispensable à la traduction, l'autre en 3' de 400 nucléotides (15).

La partie codante comporte plusieurs régions ; les deux premières correspondent au gène Pol codant pour une protéine de 700 kDa, la polymérase virale et représentent les 2/3 du génome viral. Le tiers restant code pour les protéines structurales principales à savoir S, M, N, E et HE, ainsi que pour des protéines non structurales dont les fonctions restent mal connues (28).

L'extrême variabilité génomique des *Coronavirus* est due en partie à l'absence de système de correction dans le fonctionnement des ARN polymérases, expliquant la fréquence des mutations, mais aussi à l'existence de recombinaisons inter génomiques (15).

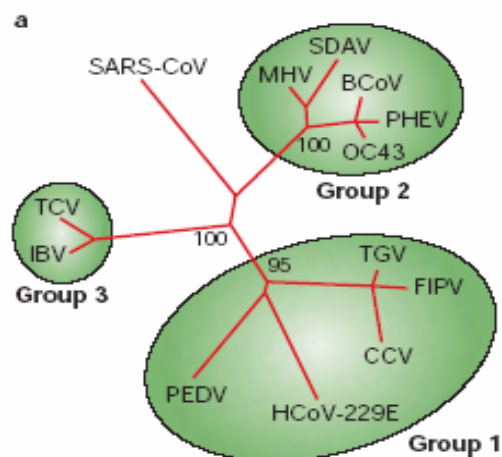
Figure 3 : Représentation schématique du génome d'un Coronavirus du groupe 1



2. Classification des *Coronavirus* félins

Au sein de la famille des *Coronaviridae* on trouve deux genres : les *Coronavirus* et les *Torovirus*. Les *Coronavirus* sont répartis en trois groupes selon leurs propriétés antigéniques et l'organisation de leur génome (figure 4) ; les *Coronavirus* félins appartiennent au premier groupe avec le virus de la gastro-entérite transmissible porcine (TGEV), le *Coronavirus* canin (CCV) et le *Coronavirus* respiratoire humain 229 E ((31) et (43)).

Figure 4 : Relations phylogénétiques au sein des *Coronavirus* – résultats basés sur l'analyse du gène *Pol* (d'après (43))



Parmi les *Coronavirus* félins, on distingue deux biotypes comprenant chacun de nombreuses souches : le FIPV, agent de la PIF, et le FECV à l'origine d'infections asymptomatiques chez les adultes et de diarrhées bénignes chez les chatons (15).

A l'heure actuelle il est impossible de les distinguer tant sur le plan antigénique que sur le plan moléculaire ; aucun diagnostic ne permet donc de déterminer si les chats sont infectés par une souche de biotype FIPV ou FECV (28).

Sur le plan sérologique on différencie deux groupes de *Coronavirus* félins, selon la réactivité qu'ils ont vis à vis de certains anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine S (10). Les souches de sérotype 1 circulent de manière prépondérante chez les animaux infectés alors que les souches de sérotype 2 proviennent d'une double recombinaison homologue entre

les souches de sérotype 1 et le *Coronavirus* canin ; elles se cultivent plus facilement en laboratoire. Cette classification ne rend pas compte des différences de virulence. Ainsi il existe des souches de type FIPV et FECV au sein des sérotypes 1 et 2 ((15), (28) et (31)).

3. Propriétés physico-chimiques

Les *Coronavirus*, de par leur caractère enveloppé, sont inactivés avec efficacité par la plupart des détergents et désinfectants usuels. Ils sont thermolabiles, inactivés en une heure à 56°C ; il est toutefois possible à température ambiante de retrouver des particules virales infectantes après 7 semaines en milieu sec et 2 semaines en milieu humide (27).

Ils sont résistants aux basses températures (4°C) ; leur résistance aux pH acides permet le passage de la barrière gastrique (27).

4. Biologie

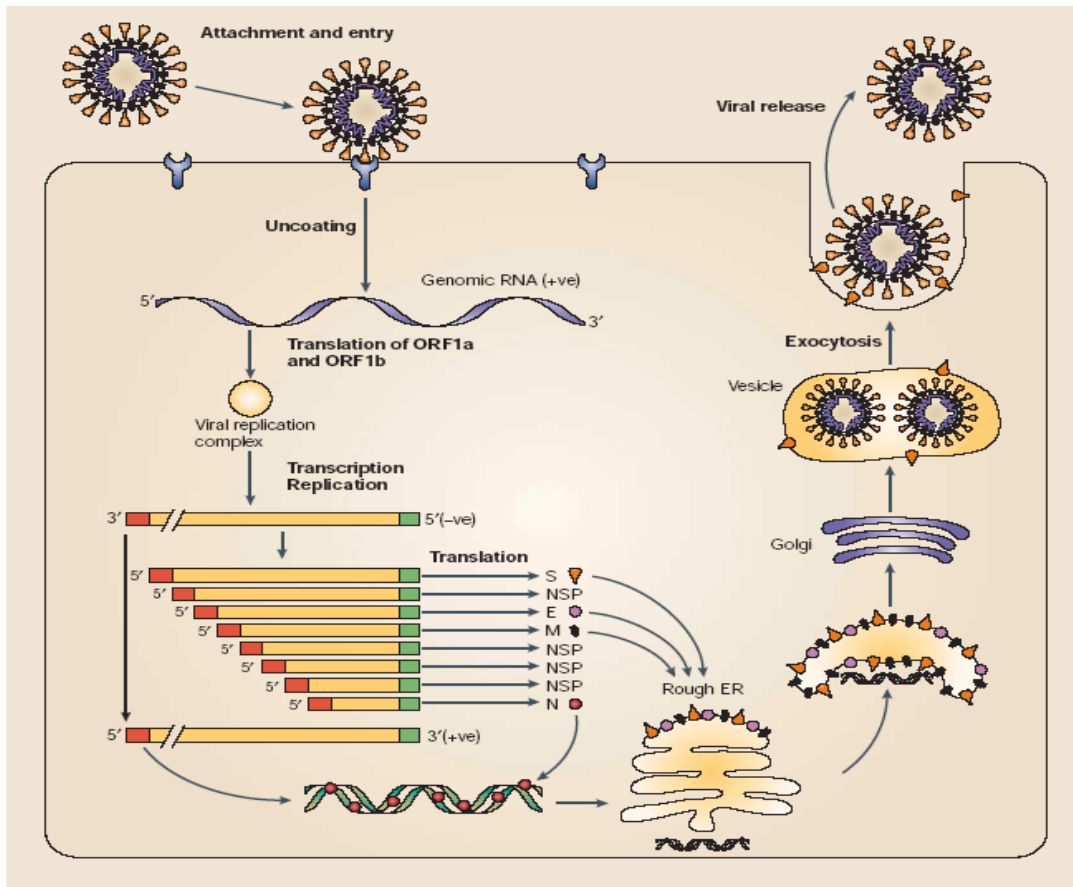
- Multiplication virale (figure 5)

Le cycle viral dure 8 à 10 heures. L'infection de la cellule est permise par l'interaction entre la protéine S et le récepteur cellulaire ; pour les *Coronavirus* du groupe 1, le récepteur identifié est l'aminopeptidase N, enzyme protéolytique située sur la membrane apicale des entérocytes et sur la membrane des monocytes (27).

Après pénétration dans le cytoplasme de la cellule hôte, l'ARN génomique est décapsidé et le gène Pol, codant pour l'ARN polymérase virale, est traduit directement par la machinerie cellulaire. Une heure après l'infection, l'ARN polymérase ARN dépendante permet l'élaboration d'un brin d'ARN qui sert de matrice pour la synthèse de 6 ARN sub-génomiques différents et de l'ARN génomique. Ensuite seule la partie 5' des ARN sub-génomiques est traduite et donne les protéines S, M, E et N, ainsi que d'autres protéines non structurales dont les fonctions ne sont pas connues ((31) et (38)).

La protéine M est maturée dans l'appareil de Golgi et S est glycosylée dans le Réticulum endoplasmique rugueux (RER). Les ARN génomiques coiffés et polyadénillés sont encapsidés. La maturation et l'assemblage en nouveaux virions se font dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG) puis l'appareil de Golgi. Les virions sont libérés par exocytose ; les cellules infectées forment des syncytia (27).

Figure 5 : Cycle viral des coronavirus (d'après (43))



- Antigénicité

- Protéine S

Lors d'infection naturelle, la réponse en anticorps anti-S neutralisants, qui stimule de plus la réponse T cytotoxique, est associée de façon positive avec l'élimination des virus de l'organisme infecté (15).

- Protéine M

Elle induit la synthèse d'anticorps neutralisants seulement en présence du complément (27).

- Protéine N

Elle induit une réponse en anticorps mais ces derniers ne sont pas neutralisants (1).

- Franchissement de la barrière d'espèce par les *Coronavirus*

De nombreuses données de la littérature montrent que les *Coronavirus* forment un groupe dynamique, en constante évolution, et capables de franchir la barrière d'espèce. Ainsi le *Coronavirus* humain OC43 du groupe II résulte d'une adaptation du *Coronavirus* bovin et le *Coronavirus* responsable du SRAS trouve ses origines chez la chauve-souris (43).

Les transmissions interspécifiques sont sans doute aussi possibles au sein du groupe 1. En effet, il a été démontré *in vitro* que les *Coronavirus* porcins (TGEV), humains (HCV 229-E) et canins (CCV) peuvent utiliser comme récepteur cellulaire l'aminopeptidase N féline. Le chat pourrait donc être infecté non seulement par les *Coronavirus* félins mais aussi par d'autres *Coronavirus* du groupe 1. L'existence du sérotype II (souches 79-1146 et 79-1183) du FECV issu d'une double recombinaison homologue entre le FCV sérotype I et le CCV prouve indirectement que le chat peut-être infecté au moins par le *Coronavirus* canin (22).

II. La péritonite infectieuse féline

1. Pathogénie

L'infection se fait par voie oronasale, puis le virus se multiplie en premier lieu dans l'oropharynx, l'appareil respiratoire supérieur ou l'intestin selon la voie de pénétration, et éventuellement dans les nœuds lymphatiques locaux régionaux ((28) et (31)).

Une virémie transitoire apparaît 2 à 6 jours après l'infection, au cours de laquelle le virus est transporté par les monocytes en majorité. Cette phase est invisible cliniquement la plupart du temps (27).

L'évolution ultérieure dépendrait de différents facteurs (voir figure 6), à savoir :

- la souche virale : les souches FECV restent localisées à l'intestin grêle et peuvent provoquer une diarrhée bénigne chez le chaton ; en revanche les souches de FIPV colonisent d'autres organes par diapédèse des monocytes infectés. *In vitro*, la virulence de certaines souches apparaît d'ailleurs corrélée à leur capacité à se répliquer dans les lignées cellulaires de monocytes et à induire l'apoptose des lymphocytes T par l'intermédiaire de ces monocytes infectés (18) ; ce changement de tropisme va permettre au virus de disséminer dans tout l'organisme. La capacité du virus à infecter les monocytes serait liée à la région membranaire de la protéine S (41) (voir figure 6).
- le statut immunitaire

Une réponse immune préexistante à l'infection peut dans certaines conditions aggraver l'évolution de la maladie. Après inoculation expérimentale par un FIPV, certains chats à sérologie positive vis à vis d'un *Coronavirus* ont développé la maladie plus rapidement et plus sévèrement que des chats séronégatifs ; il semblerait que des anticorps dirigés contre la protéine S formeraient avec les virus des immuns complexes reconnus par les récepteurs Fc des macrophages, facilitant ainsi l'infection des ces cellules (34). Des essais vaccinaux ont confirmé ce phénomène : en utilisant un vaccin recombinant contenant le gène codant pour la protéine S, les chats n'ont pas été protégés mais sont morts au contraire plus rapidement après l'exposition à un virus virulent ((27) et (45)).

Dans les conditions naturelles en revanche, il semblerait que la capacité des chats à éliminer l'infection soit corrélée avec l'intensité de la réponse humorale dirigée contre les protéines M et S ((16) et (17)).

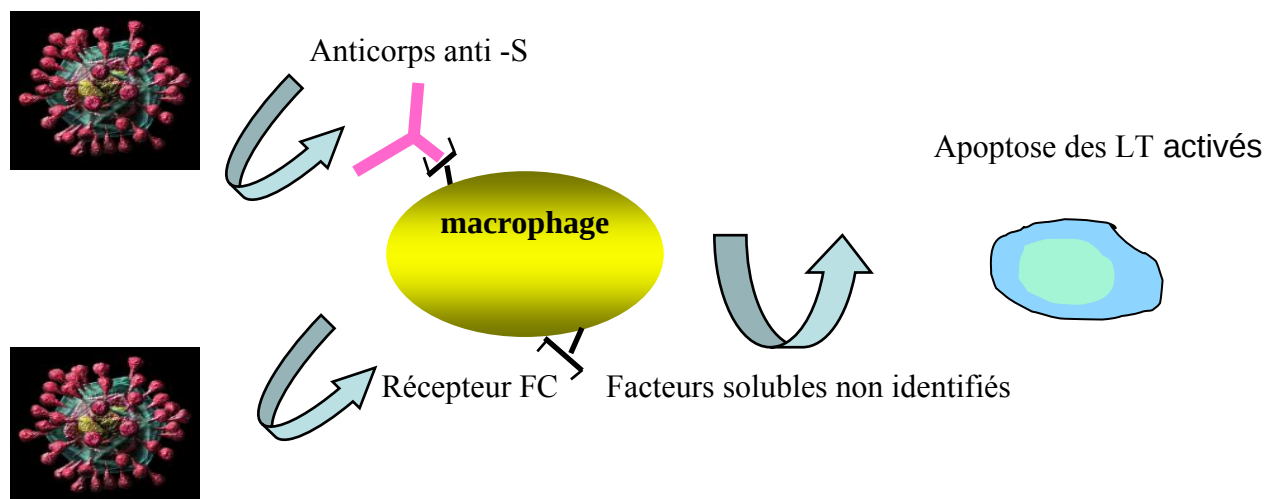
Ces observations contradictoires pourraient s'expliquer par des différences de propriété entre les souches de laboratoire et les souches primaires, ou encore par les conditions d'inoculation expérimentale (15) (voir figure 6).

- les déterminants génétiques : la plus grande fréquence des cas de PIF chez les chats de race pourrait être seulement lié au facteur d'exposition accru concernant la vie en collectivité ; en revanche on a observé chez les tigres une plus forte létalité suite aux infections à *Coronavirus* félins, qui pourrait s'expliquer par un déterminisme génétique affectant les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité. Enfin une étude portant sur 22 chats infectés expérimentalement par du FIPV a montré que

certaines chats (9 sur 22) n'entretenaient pas l'infection virale dans leurs monocytes sanguins, ce qui laisse supposer l'intervention de facteurs génétiques (28).

Figure 6 : Hypothèses pouvant expliquer la pathogénie de la PIF (d'après (18))

Facilitation de l'infection par les anticorps anti-S ?



Souche particulière de Coronavirus félin ?

2. Epidémiologie

- Epidémiologie descriptive

La PIF touche les félinés et principalement les chats, les lions, les tigres et les guépards ((9) et (20)).

La maladie est rare ; sans tenir compte des chatteries et des refuges, si 10 à 40 % des chats sont infectés par le *Coronavirus félin* (estimations très large), seuls 2 à 15 % des chats infectés, selon les auteurs, développeront une PIF. Néanmoins son importance n'est pas à négliger car le nombre de cas diagnostiqués augmente d'année en année (9) et (12).

Au sein des chatteries, soit aucune réponse sérologique positive n'est observée, ce qui signifie qu'il n'y a pas eu de contact avec un *Coronavirus félin* ; soit au contraire 80 à 90% de l'effectif sont séropositifs ; le taux d'incidence de la maladie est alors estimé à 5% et elle évolue de façon enzootique ((13) et (27)).

La PIF est cosmopolite et touche surtout les jeunes entre 6 mois et 2 ans. Les chatons de moins de 6 mois ne déclarent que rarement cette maladie, sans doute en raison d'une protection initiale par les anticorps maternels ainsi que d'une période d'incubation de la maladie de plusieurs semaines (14).

Le guépard est plus sensible à la maladie, avec un taux de létalité de 60%. Le facteur de risque connu chez cette espèce est l'âge, avec un risque accru lors d'une infection avant l'âge de 3 mois par un *Coronavirus* félin (20).

- Epidémiologie analytique

Les chats malades représentent une source indéniable de contamination. Toutefois, il semblerait que les chats porteurs asymptomatiques soient la source majeure de contamination :

- l'excrétion virale serait plus faible chez les animaux cliniquement atteints (28);
- une souche de *Coronavirus* bénigne pour un animal donné peut être responsable de PIF pour un autre animal, en raison de facteurs de susceptibilité propres (12);
- il est possible qu'un animal initialement infecté par une souche bénigne développe une PIF suite à une mutation génétique de la souche avirulente au cours de la multiplication virale (31).

Les *Coronavirus* félins sont principalement excrétés dans les matières fécales pour les souches FECV alors que le FIPV peut être excrété par d'autres voies comme la salive ou les urines. Tout chat séropositif, même à taux très bas, peut être excréteur ; en revanche les chats séronégatifs ne sont pas excréteurs sauf s'ils sont en phase de séroconversion (12).

La voie oronasale est comme nous l'avons dit la principale voie de contamination. Un contact étroit entre animaux paraît nécessaire, l'hypothèse d'une transmission indirecte (aliment, litière, éleveur) ne pouvant être exclue ((3) et (9)).

L'infection concomitante par le virus leucémogène félin ou le virus de l'immunodéficience féline est un facteur prédisposant à la maladie chez le chat (28).

- Epidémiologie synthétique

L'existence simultanée en particulier au sein des collectivités, de très nombreux chats infectés par des *Coronavirus* félins et d'un nombre de cas clinique faible en comparaison est le fait dominant de l'épidémiologie de la PIF, dont l'explication reste aujourd'hui incertaine (12).

Nous avons vu que la situation est complexe, et qu'il n'est pas exclu que dans des effectifs infectés par une souche dite non pathogène apparaissent des cas sporadiques des PIF. Ainsi tout élevage infecté par un *Coronavirus* félin, identifié sur la base de réponse sérologique positive, doit être considéré à risque de voir apparaître un cas de PIF, même si ce risque est faible ((12) et (31)).

3. Symptômes

La période d'incubation se situe entre 1 mois à plus d'un an dans les conditions naturelles, alors qu'elle est de 15 jours lors d'inoculation expérimentale (28).

La maladie débute par des symptômes non spécifiques : anorexie, abattement (58,1% des cas), fièvre ne rétrocedant à aucune thérapeutique (63,3% des cas), déshydratation (41,9% des cas) ou anémie (37,5% des cas). La phase d'état peut ensuite prendre deux formes distinctes, qui peuvent coexister chez certains animaux ((9) et (12)).

La réponse immune semble déterminer la forme de la maladie.

En cas de forte immunité humorale et d'une immunité cellulaire absente, on aura une forme humide : la présence de complexes immuns au niveau des endothéliums vasculaires entraîne l'activation de la cascade du complément et induit une réaction inflammatoire intense, avec nécrose de l'endothélium et infiltration par des polynucléaires. Ces lésions vasculaires permettent la fuite liquidienne dans les espaces intercellulaires (13).

En cas de forte immunité humorale et d'une immunité cellulaire modérée, on aura une forme sèche. Les macrophages infectés se fixent sur les parois vasculaires, provoquant des lésions de vascularite de type pyogranulomateux péri vasculaires ((9) et (12)).

- Forme humide ou exsudative

C'est la forme la plus classique, elle représente 60 à 80% des cas de PIF selon les études (9).

Elle se traduit par une péritonite (63% des chats) et/ou une pleurésie (22% des chats), accompagnées par une ascite et/ou un épanchement pleural. Dans les deux cas il s'agit d'un exsudat jaunâtre épais et visqueux. L'épanchement peut concerner simultanément les deux cavités (15% des cas). Enfin des localisations plus rares peuvent être observées : péricarde, ... (13), (14) et (28).

La quantité de liquide collectée dans l'abdomen peut aller de 10mL à 1L ; l'abdomen apparaît alors distendu symétriquement, avec un signe du flot positif. Il est à noter que la distension est progressive et non douloureuse (31).

Il est très souvent observé des signes d'insuffisance respiratoire (dyspnée, discordance,...) résultant de la compression diaphragmatique due à l'épanchement abdominal ou de la compression pulmonaire due à l'épanchement pleural (15).

La durée de la maladie est très variable ; de quelques jours chez les jeunes chats, elle peut durer au contraire plusieurs semaines chez les chats plus âgés. Mais dans tous les cas l'issue est fatale (27) et (28).

- Forme sèche ou parenchymateuse

La distinction avec la forme humide n'est pas toujours évidente. Dans de nombreux cas les animaux présentent des symptômes compatibles avec les deux formes ; d'autre part les deux formes peuvent coexister : dans plusieurs cas de forme sèche l'échographie a montré l'existence d'un épanchement, même en faible quantité (9).

Dans cette forme les symptômes sont dus à des lésions pyogranulomateuses de localisation variée, d'où la diversité des tableaux cliniques possibles (28).

Des signes nerveux sont observés dans près de 25% des cas. Ils signent une atteinte diffuse, siégeant en majorité dans le système nerveux central (87% des cas). Les motifs de consultation sont le plus souvent des convulsions, un pica, une incontinence et des troubles comportementaux (30). L'examen neurologique montre ainsi fréquemment :

- o une ataxie
- o une hyperesthésie
- o une baisse de la vigilance
- o une diminution des réflexes médullaires
- o une parésie
- o un nystagmus

Des troubles oculaires sont également très fréquents (36% des cas) et coexistent souvent avec des troubles neurologiques (9). L'anomalie la plus fréquente est l'uvéite pyogranulomateuse, le plus souvent dans la chambre antérieure, avec douleur oculaire, blépharospasme et myosis. On peut également avoir des dépôts cornéens, de la fibrine dans la chambre antérieure (effet tyndall), une rétinite et une anisochorie (9) et (13).

Les tableaux cliniques d'insuffisance rénale ou hépatique peuvent être rencontrés lors de lésions au niveau de ces organes (28).

4. Lésions

- Forme humide

Les lésions caractéristiques sont les épanchements abdominaux, pleuraux et péricardiques, auxquels sont fréquemment associés des dépôts de fibrine sur les séreuses des cavités correspondantes (14).

Les lésions pyogranulomateuses des séreuses et organes, de la taille d'une tête d'épingle et blanchâtre, sont assez caractéristique de la PIF (12).

- Forme sèche

Seules sont mises en évidence des lésions pyogranulomateuses sous forme de foyers pyogranulomateux péri vasculaires dans les différents organes atteints (reins, foie, système nerveux central, ...) (27).

5. Diagnostic

Une bonne anamnèse et une prise de commémoratifs rigoureuse permettent parfois d'orienter le diagnostic différentiel (par exemple pour un chat dyspnéique polytraumatisé on pensera d'abord aux hypothèses d'hémithorax ou de hernie diaphragmatique) (15).

Le tableau clinique étant très peu spécifique, le diagnostic différentiel est très large et le recours aux examens complémentaires est indispensable. Il convient de les associer afin d'obtenir des valeurs prédictives élevées.

Une très forte suspicion est obtenue après l'élimination de toutes les autres causes pouvant être à l'origine des mêmes symptômes ; toutefois le diagnostic de certitude n'est obtenu qu'après un examen histologique montrant des lésions pathognomoniques (15) et (27).

- **Tableau 1** : Diagnostic différentiel de la PIF (d'après (10) et (28))

Epanchement abdominal	Péritonite bactérienne Tumeur abdominale Pancréatite Ascite d'origine cardiaque, hépatique ou rénale
Epanchement pleural	Pleurésie bactérienne Tumeur Hernie diaphragmatique Hémothorax Chylothorax Ascite d'origine cardiaque, hépatique ou rénale
Fièvre d'étiologie indéterminée	FeLV, FIV Toxoplasmose Maladie auto-immune Rickettsiose Abscess Tumeur
Insuffisance hépatique	Anémie hémolytique Complexe cholangio-hépatite-pancréatite Tumeur Obstruction biliaire
Insuffisance rénale (IR)	IR chronique idiopathique Toxique Maladie kystique Pyélonéphrite Tumeur Obstruction des voies urinaires (IR post rénale)
Lésions oculaires	FeLV, FIV Toxoplasmose Affections du cristallin Rétinopathie hypertensive
Troubles neurologiques	FeLV, FIV Toxoplasmose Encéphalopathies métaboliques Ischémie Infiltration néoplasique

- Imagerie médicale

L'intérêt d'une radiographie du thorax ou de l'abdomen est de confirmer la présence d'un épanchement et de différencier un épanchement pleural d'une hernie diaphragmatique.

Une échographie abdominale peut permettre de faire le diagnostic différentiel avec une tumeur (hépatique, rénale), une polykystose rénale, un shunt porto-systémique ou encore une pancréatite si elle est associée à une biopsie. Lorsque c'est possible, une paracentèse écho guidée est préférable, surtout lors d'épanchement pleural (10).

- Analyse du liquide d'épanchement

Macroscopiquement, le liquide d'épanchement caractéristique d'un exsudat aseptique : jaune, visqueux et coagulant à l'air libre vu sa concentration élevée en protéines (10).

La densité optique de ce liquide est supérieure à 1,018, la concentration protéique est supérieure à 35g/L et la numération leucocytaire est modérée (2000 à 6000 cellules/micro litre).

Toutes ces caractéristiques sont communes aux exsudats aseptiques ; avec cette seule analyse, on ne peut exclure une pancréatite (ascite), une hernie diaphragmatique (épanchement pleural) ou une tumeur dans les deux cas ((12) et (17)).

En revanche, ces tests ont une sensibilité très élevée, proche de 100% ; ils ont donc une valeur prédictive négative très bonne lorsqu'on les emploie lors de faible suspicion clinique, afin d'éliminer l'hypothèse de PIF (par exemple chez un chat de 6 ans avec des crises convulsives comme unique symptôme se rattachant à la PIF) ((10) et (28)).

Par immunofluorescence indirecte on peut mettre en évidence le virus au sein des cellules du liquide d'épanchement. Ce test a une sensibilité de 95% et une spécificité de 100% puisque les souches entériques bénignes de *Coronavirus* ne sont jamais retrouvées que dans les selles et dans le sang; toutefois il n'est disponible que dans certains centres spécialisés ((9) et (1)).

- Tests biochimiques sanguins

Dans les cas de PIF on observe une augmentation des protéines totales, avec une valeur supérieure à 78g/L chez 50% des chats atteints de forme humide et 75% des chats atteints de forme sèche. Un tracé électrophorétique des protéines montre qu'il s'agit en particulier des fractions alpha2, bêta et gamma globulines ; en général, une hypoalbuminémie avec diminution du rapport albumine sur globuline est associée ((10) et (49)).

Une élévation des phosphatases alcalines et des alanines amino-transférases montre de façon non spécifique une atteinte hépatique, de même qu'une élévation de l'urée et de la créatinine témoigne d'une atteinte rénale (28).

- Numération et formule sanguine

50% des chats atteints développent une anémie arégénérative modérée, fréquemment associée à une leucocytose neutrophilique et une lymphopénie (41).

- Histologie

Seul examen permettant un diagnostic de certitude (excepté l'immunofluorescence indirecte sur liquide d'épanchement en cas de PIF humide), il peut être réalisé lors d'un examen nécropsique et parfois après une biopsie. Dans ce dernier cas les prélèvements à privilégier sont le rein, le foie, la rate, le mésentère et le ganglion mésentérique (28).

Lors de biopsie une attention particulière doit être apportée au risque d'hémorragie, en raison du caractère friable des organes lésés ainsi que d'éventuels troubles de l'hémostase liés à l'évolution de la maladie (12).

Les lésions pathognomoniques sont la vascularite et le pyogranulome (13).

- Sérologie

Les anticorps sont détectables une semaine après l'infection et atteignent une concentration maximale au bout de 5 à 6 semaines. Toutefois ce délai peut varier en fonction de la dose infectante. Les chats qui survivent à l'infection virale voient leur titre baisser puis s'annuler au bout de 6 mois ((1) et (6)).

Les techniques les plus couramment utilisées sont l'immunofluorescence et les tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), utilisant comme antigène le virus de la PIF ou un virus antigéniquement apparenté comme le virus de la gastro-entérite transmissible porcine. Compte tenu des étroites communautés antigéniques entre ces virus, l'utilisation du virus de la PIF n'apporte aucun avantage en matière de spécificité ((12) et (42)).

Quelle que soit la technique utilisée, il est impossible de différencier les anticorps induits par des souches bénignes de ceux induits par les souches responsables de la PIF. En conséquence le résultat sérologique ne permet pas à lui seul de poser un diagnostic de certitude (1).

Le clinicien doit ainsi interpréter le résultat en fonction des données cliniques et épidémiologiques, ainsi que des résultats des autres examens complémentaires (12).

- Interprétation des tests sérologiques chez un chat malade

Un résultat positif, quel qu'en soit le titre, doit être considéré comme compatible avec un diagnostic de PIF mais ne permet en aucun cas de conclure à une PIF, vu la grande fréquence des chats sérologiquement positifs parmi les animaux non malades. Ce test, isolé, est peu spécifique : d'après une étude rétrospective sur 224 chats malades dont 28 effectivement atteints de PIF, la valeur prédictive positive de ce test serait de 13,8% ; en revanche, selon la même étude, la valeur prédictive combinée d'une sérologie positive avec un titre en anticorps supérieur à 160, une lymphopénie et une hyperglobulinémie est de 88,9% ((1) et (42)).

Deux résultats négatifs à 15 jours d'intervalle (absence de séroconversion) permettent dans la majorité des cas d'exclure l'infection par le virus de la PIF. Toutefois la sérologie peut être négative chez un chat en fin d'évolution de la maladie ; ce phénomène résulterait d'un piégeage des anticorps au sein des complexes immuns ((28) et (49)).

- Chez un chat en bonne santé

Un résultat positif signe l'existence préalable d'un contact avec un *Coronavirus* félin, sans présumer du pouvoir pathogène de la souche en question. Un tel chat doit être considéré

porteur du virus et potentiellement dangereux : même s'il ne développe aucun symptôme de PIF, il peut transmettre l'infection virale à un autre chat qui pourra développer la maladie.

D'autre part, la sérologie, quel que soit le titre en anticorps, n'est pas prédictive de l'évolution clinique de l'infection. Enfin l'interprétation d'une sérologie positive n'est possible que sur un chat âgé de plus de 12 semaines : avant cet âge, on risque de détecter les anticorps d'origine maternelle ((1), (15) et (42)).

Un résultat négatif témoigne de l'absence d'infection par un *Coronavirus* (12).

- Amplification du génome viral

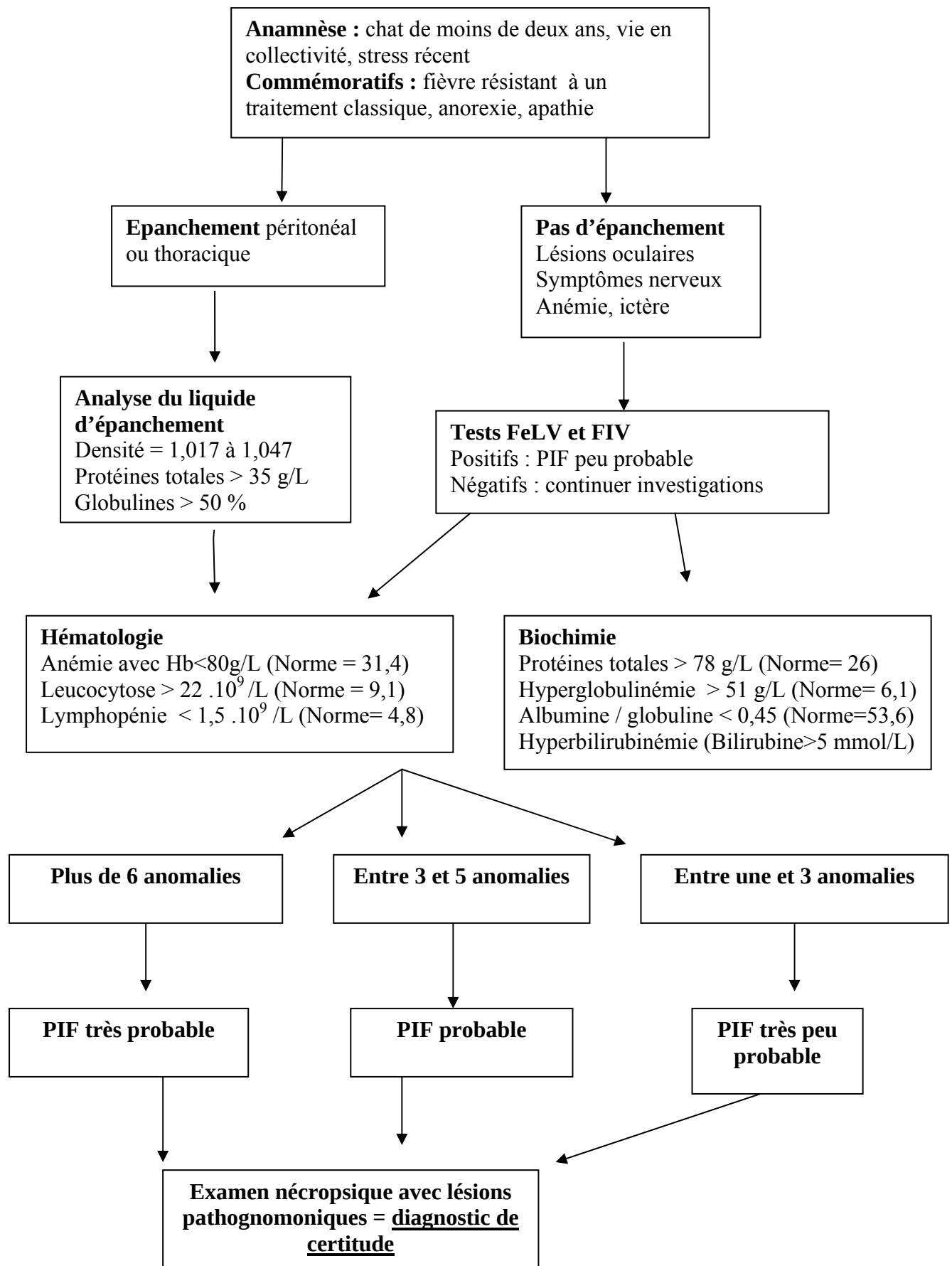
Il existe plusieurs techniques, très sensibles ; certaines sont quantitatives.

Elles sont réalisables à partir de sang, de liquide d'épanchement, de liquide céphalorachidien et de fèces, à condition de garder ces prélèvements à 4°C pour éviter la dégradation du génome viral (28).

En revanche, ces techniques manquent de spécificité : même sur le plan génomique, il est impossible de différencier les souches bénignes de celles responsables de PIF. On conviendra d'avoir ainsi la même démarche diagnostique que pour les tests sérologiques en cas de suspicion de PIF (3).

La recherche du génome viral dans les selles permet d'identifier les animaux excréteurs, ce qui peut avoir un intérêt important dans une chatterie ((3) et (28)).

- **Figure 7** : Algorithme décisionnel en cas de suspicion de PIF (d'après (28))



6. Thérapeutique

Il n'existe à l'heure actuelle aucune thérapeutique dont l'efficacité soit démontrée. Les traitements visent à améliorer le confort de l'animal. La ponction régulière du liquide d'épanchement permet de diminuer la gêne respiratoire occasionnée. Les traitements symptomatiques de l'insuffisance hépatique et rénale doivent être mis en place (33).

L'utilisation de corticoïdes à dose immunosuppressive (2 à 4 mg/kg) permet de diminuer les effets de la vascularite. Un protocole suivant, les associant à un anti-viral, l'interféron oméga, semble prometteur chez les chats atteints de PIF humide ((10) et (28)):

- vidange totale de l'épanchement ;
- administration de dexamétazone à la dose de 1mg/kg par voie intra cavitaire ;
- Interféron oméga tous les deux jours par voie sous cutanée ;
- corticothérapie : prednisolone à la dose de 2mg/kg puis diminution progressive de la dose dès la rémission des symptômes

Ce traitement a été efficace chez un animal sur deux, l'épanchement ayant disparu en sept jours avec des rémissions cliniques de l'ordre de quatre à cinq mois en moyenne. Mais l'issue de la maladie reste toutefois fatal ((10) et (15)).

7. Prophylaxie

- Prophylaxie sanitaire

Les mesures suivantes concernent essentiellement les chatteries et les élevages. La vente d'un chaton infecté constitue un vice rédhibitoire ; un seul test positif vis à vis des *Coronavirus* est suffisant pour faire valoir ses droits au vendeur (loi du 22 juin 1989, arrêté du 2 août 1990-article 285 du code rural) ((4) et (27)).

Pour les chatteries saines, il faut éviter la surpopulation (pas plus de trois chats par litière) et entretenir convenablement les litières, réaliser des quarantaines de deux mois avec deux contrôles sérologiques négatifs avant l'introduction permet de limiter l'infection (1).

De plus, il faut différer l'introduction d'un chaton jusqu'à ce qu'il puisse subir un test et que celui-ci soit interprétable : 12 semaines d'âge pour un test sérologique (22).

La RT-PCR n'est pas utilisée pour l'instant dans ce cadre vue la possibilité d'excrétion et de virémie intermittentes ((5) et (15)).

Le personnel soignant et le matériel doivent être soumis aux mesures d'hygiène habituelle : lavage des mains, utilisation de pédiluves, désinfection avec des produits usuels, ...

Au sein d'un élevage infecté, la lutte contre l'infection est très difficile : toute chatterie présentant une infection enzootique par un *Coronavirus* risque de voir se développer un jour une PIF au sein de son élevage ou chez des chatons vendus à l'extérieur ((1) et (21)).

La première mesure à prendre est d'interdire tout échange avec l'extérieur, en arrêtant les expositions et les saillies (27).

La source principale de contamination étant la voie oro-fécale, il est nécessaire de veiller à une hygiène stricte avec notamment mise en place d'une litière pour deux chats au plus et nettoyage quotidien des litières. L'environnement doit être aussi pris en compte afin de limiter la persistance de *Coronavirus* dans le milieu extérieur : lavage des sols, des murs, hygiène du personnel ... (28)

Il est fortement conseillé de réaliser des contrôles sérologiques réguliers sur l'ensemble de l'effectif ; si les mesures sont efficaces, la plupart des chats vont être capable d'éliminer le

virus et de retrouver un statut d'indemne ; toutefois les chats restant positifs au delà d'un an doivent être considérés comme infectés chroniques et faire l'objet de recherche par RT-PCR de virus dans les matières fécales ((5) et (15)).

En ce qui concerne les chatons, l'idéal est d'arrêter la reproduction afin de conserver un effectif faible, de limiter les contacts étroits au moment des saillies et la contamination des nouveaux animaux. Jusqu'à l'âge de 4-5 semaines les anticorps maternels permettent une protection efficace du chaton ; leur concentration sanguine commençant à diminuer à 6 semaines d'âge, le sevrage précoce (4 à 5 semaines) semble être une bonne méthode visant à limiter les risques d'infection, la contamination se faisant majoritairement par la mère chez le chaton (5).

- Prophylaxie médicale

Plusieurs approches ont été étudiées ; aucune ne s'est avérée véritablement efficace. Un vaccin utilisant une souche virale thermosensible atténuée est commercialisé aux Etats Unis et dans quelques pays européens ; injectable par voie intra-nasale, ce vaccin ne pose pas de problème d'innocuité mais son efficacité semble limitée ((1) et (5)).

8. Pronostic

Une fois les symptômes déclarés le pronostic est sombre, avec un taux de mortalité de 95%. La durée d'évolution de la maladie dépend du nombre et de la nature des organes lésés (1).

L'état clinique de l'animal joue aussi un rôle pronostique : tant que le chat a des signes cliniques modérés, le traitement peut lui permettre de survivre plusieurs mois avec une bonne qualité de vie. En revanche lors d'anorexie prolongée ou lors d'apparition de signes neurologiques, le traitement est malheureusement illusoire : les chats atteints de PIF humide survivent dès lors quelques semaines et ceux atteints de PIF sèche quelques mois (21).

La mort est le plus souvent due à une insuffisance hépatique ou rénale venant se rajouter au tableau clinique initial (7).

9. Conclusions et perspectives

La PIF est ainsi difficile à diagnostiquer et le traitement illusoire ; sa maîtrise passe donc par une prophylaxie efficace, grâce à une bonne connaissance de son épidémiologie.

Si la prévalence des infections à *Coronavirus* félin est bien connue en chatterie, elle l'est beaucoup moins bien chez les chats de particulier, population à priori à risque de développer la PIF.

Enfin, excepté la vie en collectivité, on connaît mal les facteurs favorisant le développement de la maladie, et surtout en ce qui concerne les chats de particulier. Des contacts fréquents avec un ou plusieurs chiens pourraient être un de ces facteurs favorisant. Mais à l'heure actuelle, rien ne permet de l'affirmer. Il serait intéressant dans un premier temps de comparer les souches de *Coronavirus* félins et canins excrétés par dans les selles de chats et de chiens vivants ensemble. Sont-elles proches phylogénétiquement ?

PRESENTATION DES PROJETS D ETUDE

Notre premier objectif a été d'évaluer le taux de d'infection à Coronavirus chez les chats de particuliers au sein d'une même clinique vétérinaire de la région parisienne durant l'année 2004. Cette étude n'avait de prétention à aucune extrapolation ; elle se voulait simplement indicatrice du taux de prévalence des infections à *Coronavirus* dans la clinique concernée en 2004.

Dans cette optique nous avons recherché la présence de *Coronavirus* félins soit dans le sang, soit dans les fécès, ainsi que les anticorps dirigés contre ces virus. Des prélèvements ont été réalisés sur des chats de particulier à priori asymptomatiques et âgés de 1 an à 15 ans.

L'outil utilisé pour déterminer la virémie et l'excrétion virale a été la RT-PCR ; cette étude aura été l'occasion de développer cette technique dans le laboratoire de virologie de l'ENVA où elle n'avait jamais été appliquée aux *Coronavirus* félins. C'est une méthode très sensible, mais peu spécifique du virus de la PIF : elle ne met en évidence que des *Coronavirus* de groupe 1, sans présumer du caractère pathogène de la souche virale ((3), (21) et (24)).

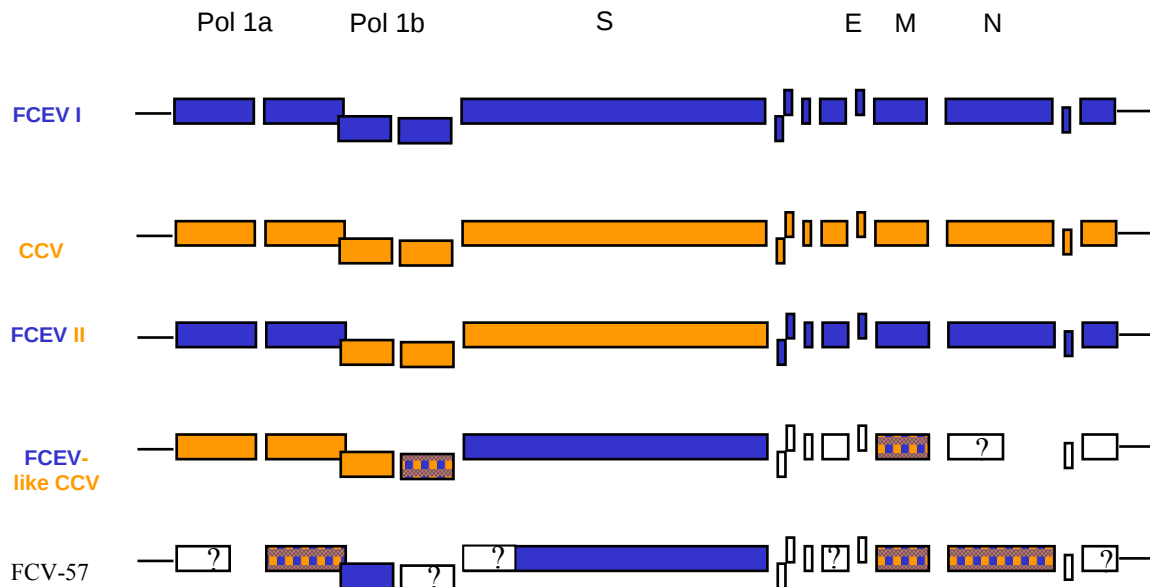
Les sérologies ont été déterminées par la technique classique d'immunofluorescence indirecte qui ne permet pas non plus de distinguer les souches FIPV pathogènes des souches FECV bénignes ((23) et (49)).

Notre deuxième objectif était d'évaluer les possibilités de transmission de *Coronavirus* entre chats et chiens.

La très grande proximité antigénique entre les *Coronavirus* félins et canins peut favoriser la circulation virale entre ces deux espèces. Plusieurs données de la littérature sont d'ailleurs en faveur de cette hypothèse :

- le FCEV de type II est issu d'une recombinaison sur la région du génome correspondant à la protéine S entre le FCEV de type I et le CCV (22);
- des analyses portant sur la séquence S ont également montré l'existence d'un nouveau type de CCV qui est génétiquement plus proche du FCEV ; cette souche est également plus proche du FCEV en ce qui concerne le gène M et a été baptisée FCEV-like CCV ; on soupçonne ce nouveau type de CCV d'être à l'origine de diarrhée hémorragique sévère chez le chien (37);
- toujours concernant le gène M, Benetka et *al.* ont montré l'existence de souches occupant une place intermédiaire entre le FCEV et le CCV dans l'arbre phylogénétique, avec notamment une souche isolée à partir d'un chat et ayant au plus 88% d'homologie avec les autres souches de FCEV sur le gène M ; mais dans cette étude les chats ne vivaient pas en contact avec des chiens (8);
- une souche (FCV-57) isolée à partir d'un chat de particulier vivant avec un chien s'est révélée occuper une position intermédiaire entre le FCV et les CCV (29);
- de plus, il a été démontré que des *Coronavirus* porcins (TGEV), humains (HCV 229-E) et canins (CCV) appartenant au groupe 1 pouvaient utiliser comme récepteur cellulaire l'aminopeptidase féline *in vitro* (44).

Figure 8 : Comparaison des génomes des souches de Coronavirus décrites précédemment.



Tous ces résultats sont des arguments en faveur d'une transmission de *Coronavirus* entre chiens et chats qui serait à l'origine de recombinaisons génomiques entre ces virus, et à fortiori d'un rôle éventuel du chien dans l'épidémiologie de la PIF.

Afin de documenter cette possibilité de transmission interspécifique nous avons **étudié la circulation de Coronavirus au sein d'une SPA**, espace confiné où des chiens et des chats sont en contact étroits. Pour ce faire nous avons suivi l'excrétion de *Coronavirus* dans leurs selles et procédé au **génotypage** des virus trouvés en ce qui concerne les gènes M et N.

DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE :

DEUX ETUDES SUR L EPIDEMIOLOGIE DE LA PIF

- Première étude : évaluation du taux d'infection à *Coronavirus* chez les chats de particuliers dans une clinique de la région parisienne en 2004.
- Deuxième étude : circulation de *Coronavirus* dans une collectivité.

I. Matériel et méthodes

1. Les animaux

- Première étude : taux d'infection à *Coronavirus* chez les chats de particuliers (2004)

Au sein d'une clinique parisienne, 100 chats ont subi des prises de sang et des écouvillonnages rectaux à l'occasion d'une anesthésie générale, à l'origine dévolue à leur castration. Au moment de l'étude, tous ces chats ont entre 1 an et 15 ans. Ils appartiennent à des clients de cette clinique ou viennent d'une association qui s'occupe du recueil des chats errants, « l'école du chat ».

Nous n'avons gardé que 68 chats pour notre étude car pour les 32 autres soit l'écouvillon rectal soit la prise de sang n'ont pu être réalisés.

- Deuxième étude : circulation de *Coronavirus* dans une collectivité

Il s'agit de 7 chiens et 17 chats en bonne santé et vivant ensemble au sein d'une SPA située à Vaux-le-pénil, près de Melun (77). Sur les 7 chiens, 4 sont directement en contact avec les chats (chiens n° 11, 19, 20 et 21) et 3 n'ont jamais accès à la chatterie (chiens n° 22, 23 et 24).

Les chats participant à l'étude séjournent dans des cages réparties dans deux salles séparées par une porte. Ces cages se situent à une hauteur variable, certaines sont proches du sol et permettent le contact de museau à museau entre les chats et les chiens qui circulent indifféremment dans les deux salles.

Les cages sont nettoyées tous les jours avec des produits à base de javel ; pendant le nettoyage, les chiens ont parfois encore accès aux salles alors que les chats sont mis dans des cages de substitution où ils peuvent être en contact avec les chiens de museau à museau.

Le nom, l'âge et le temps de contact entre les animaux sont résumés dans le tableau suivant. Ils sont numérotés de 1 à 24 selon l'ordre de ce tableau. « CT » signifie chat et « CN » signifie chien.

Tableau 2: Chiens et chats de la SPA entrant dans l'étude sur la circulation virale

		Espèce	Age	temps de contact avec les chiens
1	TEDDY	CT	1 an	1 an
2	BINGO	CT	1 an	1 an
3	VOLCANA	CT	1 an	1 an
4	TARZAN	CT	2 ans	2 semaines
5	DIABOLO	CT	2 ans	3 mois
6	LORETTE	CT	1 an	1 mois
7	LORNA	CT	1 an	1 mois
8		CT	1 an	1 semaine
9	DIVA	CT	1 an	2 semaines
10	MITSI	CT	2 ans	2 semaines
11	ALCALINE	CN	1 an	3 mois
12	ORPHEE	CT	2 ans	1 semaine
13	CALINE	CT	2 ans	1 semaine
14	KIWI	CT	2 ans	2 semaines
15	DOUCHKA	CT	1 an	2 semaines
16	NEIGE	CT	7 ans	1 mois
17	CAPSULE	CT	5 ans	1 mois
18	ECHOEO	CT	2 ans	1 semaine
19	LALLY	CN	7 ans	3 ans
20	BILI	CN	11 ans	2 mois
21	PAGAILLE	CN	8 ans	2 mois
22	TEXAS	CN	4 ans	Pas de contact direct avec les chats
23	SPEELY	CN	11 ans	Pas de contact direct avec les chats
24	SMOOKY	CN	3 mois	Pas de contact direct avec les chats

2. Les prélèvements

Des écouvillonnages rectaux sont effectués sur tous les animaux entrant dans les deux études.

On réalise une prise de sang à la veine jugulaire sur les animaux faisant partie de l'étude sur le taux d'infection. Le sang est prélevé sur tube EDTA. Comme les écouvillons, ils sont envoyés au laboratoire de virologie de l'ENVA sous 24H afin d'en extraire les ARN.

3. Méthode de titrage des anticorps anti-coronavirus par immunofluorescence indirecte

- Préparation de tapis cellulaires infectés

On utilise des cellules PK15 (rein de porc) sensibles au virus TGEV. Le tapis cellulaire est dissocié par adjonction de trypsine puis on réalise une suspension cellulaire avec du milieu contenant du sérum de veau fœtal (milieu nutritif).

Après homogénéisation on répartit 200µL de la suspension dans chaque cupule d'une plaque de 96 puits à fond plat que l'on place ensuite à 37°C pendant 24H, dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Le lendemain on infecte les cellules avec du TGEV : on place dans chaque cupule 50µL de suspension virale et 150µL de milieu nutritif, puis on laisse incuber 24H à 37°C. Une colonne de cellules non infectées sert de témoin négatif (colonne n°1).

- Dilution des sérums de chats

Dans la plaque préparée précédemment, on met dans les cupules de la colonne n°1 (témoin négatif) et n°2 10µL de sérum auxquels on ajoute 240µL de sérum physiologique. On met ensuite 200µL de sérum physiologique dans les autres colonnes ; puis on prélève 50µL de la colonne 2 pour les mettre dans les cupules des colonnes suivantes et ainsi de suite.

On obtient ainsi des dilutions au 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125 et 1/16000.

- Titrage des anticorps anti-Coronavirus

On met en présence les sérums dilués sur les tapis de cellules de la boîte préparée précédemment. On laisse incuber l'ensemble 30 min à 37°C.

On rince ensuite la plaque 4 fois avec de l'eau physiologique stérile, puis on ajoute 50µL de solution d'anticorps de lapin anti-anticorps de chat, marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine. On effectue un dernier lavage avant de lire des plaques avec un microscope équipé pour la fluorescence.

Figure 9 : Exemple de lecture au microscope sous lumière UV

	1	2	3	4	5	6	Résultat
1	T						Positif au 1/625
2	E						Positif au 1/3125
3	M						Négatif
4	O						
5	I						
6	N						
7							
8							
dilutions	1/25	1/25	1/125	1/625	1/3125	1/16000	

4. Techniques moléculaires

- Extraction des ARN viraux leucocytaires à partir de sang total

- 150 µl de sang ou d'ascite sont mélangés avec 600 µl d'une solution commerciale RNA+ ND (Biogen) et 300 µl de chloroforme. Le tout est laissé à reposer 5 min dans la glace puis est centrifugé 15 min à 12000 tours/ minutes à 4°C.
- Le surnageant est prélevé et est mélangé à 600µl d'isopropanol ; après une nuit à -20°C pour précipiter les ARN, les tubes sont remis à centrifuger une demi-heure à 4°C afin d'obtenir un culot d'ARN.
- L'étape suivante est déterminante pour la qualité de l'extraction : il s'agit d'enlever le surnageant et de ne laisser que le culot d'ARN au fond du tube. Puis on y rajoute 300 µL d'éthanol à 70%, ce qui constitue un rinçage. Le tout est centrifugé une demi-heure à 4°C, le surnageant est enlevé et les tubes sont mis à sécher une heure à l'étuve.
- On dissout enfin les culots d'ARN dans les 50µL d'eau « RNAase free » ; les solutions sont conservées au congélateur à -80°C.

- Extraction des ARN viraux à partir d'écouvillons rectaux

Les selles récupérées par un écouvillonnage rectal sont solubilisées dans 350µL de PBS et les particules solides sont éliminées après centrifugation à 10 000 tours/min pendant 10 min.

La technique d'extraction est la même que celle décrite précédemment.

- RT-PCR

Cette technique permet de détecter la présence de génome viral de *Coronavirus* félin. Les ARN viraux subissent d'abord une transcription inverse en ADN avant d'être amplifiés.

On utilise un Kit (QIAGEN NB) dans lequel se trouvent les composants essentiels à la RT-PCR. Ils sont mélangés dans des tubes RNase free dans des proportions bien précises et sont ajoutés dans l'ordre suivant :

- o 28 µL d'eau ARN free,
- o 2µL d'un mélange de nucléotides (dNTP)
- o 10µL de tampon 5X
- o 1,5µL de chacune des deux amorces qui permettent l'initiation
- o 2µL de solution d'enzymes (transcriptase reverse et ADN polymérase),
- o 5 µL d'ARN viral à amplifier

On prépare aussi un tube témoin positif avec 5 µL d'ARN du TGEV, et un tube témoin négatif avec 5µL d'eau et avec les mêmes quantités des autres constituants.

L'ensemble de la RT-PCR dure 4H30 avec plusieurs étapes à des températures spécifiques :

- transcription reverse (30 min à 50°C)
- activation de la polymérase (15min à 95°C)
- 40 cycles d'amplification
 - i. dénaturation du brin d'ADN (1min à 94°C)
 - ii. hybridation des amorces à l'ADN (1 min à une température variable selon les amorces)
 - iii. polymérisation (1min à 72°C)
- extension finale (10 min à 72°C)

- RT-PCR sur la séquence consensus

Pour rechercher la présence de *Coronavirus* félins, les amorces utilisées sont celles décrites dans la littérature (21), permettant l'amplification de la région 3' du génome viral, région peu variable au sein des *Coronavirus* du groupe 1.

p205* : GGCAACCCGATGTTTAAACTGG

p211* : CACTAGATCCAGACGTTAGCTC

La taille du fragment amplifié est de 223 paires de bases (pb).

- RT-PCR sur les gènes M et N

On utilise le même kit que précédemment (Qiagen).

- o Pour le gène M, les amorces utilisées en première intention sont 5'ext et 3'ext : elles permettent l'amplification de gène M en entier ; sa taille est de 802 paires de bases. En cas d'échec, on effectue une RT-PCR avec les amorces 5'ext et 3'int qui ne permettent d'amplifier qu'un fragment du gène M (sa taille est de 360 paires de bases). L'amplification est effectuée à 48°C.
- o Pour le gène N les amorces utilisées en première intention sont 5'ext et 3'ext : elles permettent d'amplifier le gène N en entier (sa taille est de 1150 paires de bases) ; cette étape se fait à 52°C. En cas d'échec avec les amorces précédentes, on utilise les amorces 5'cons et 3'cons qui permettent d'amplifier un fragment du gène N (sa taille est de 400 paires de bases) ; cette étape se fait à 48°C.

Figure 10 : Séquences des primers utilisés pour les RT-PCR sur les gènes M et N

M 5'ext : TTGAACTAAACAAAATGAAG
M 3'ext : TTACACCATATGTAATAATT
M 3'int : CCGAACATTACATATCTGGAAA
N 5' int : AACTAAACTTCTAAATGGCC
N 3' ext : CGTTTCGTWACCTCAT
N 5' cons: AACAAACACACCTGGAAGA
N 3' cons : GTGTCATCAAACACATCTGT

- Migration sur gel d'agarose

Le gel est constitué de 200 mL de TBE (Triborate d'EDTA) et de 2g d'agarose. Ce premier mélange est chauffé au micro-onde 5 minutes afin de bien dissoudre l'agarose. Ensuite on ajoute une goutte de BET (bromure d'Ethidium) à cette solution d'agarose à 1%. On laisse refroidir le tout avant de le déposer dans un bloc plastique contenant un peigne ; en le retirant, des puits apparaissent.

12µL du contenu de chaque tube ayant subi la RT-PCR sont mélangés à 3µL de bleu de bromophénol. Ainsi 15 µl sont déposés dans chaque puit. Le premier puit va contenir 5µL de marqueur qui servira d'échelle de taille après migration.

Le bloc contenant le gel est constitué d'une anode et d'une cathode ; les puits sont situés à la cathode afin que les produits déposés migrent vers l'anode (ainsi les ADN, chargés négativement, migrent vers la borne positive). Les bornes sont reliées à un générateur développant un courant 200mA d'intensité en appliquant une tension de 70V, et ce pendant 40min.

Une fois la migration finie, le gel est déposé sur une plaque transparente placée au-dessus d'une source de rayons ultra violets ; ainsi sont révélées les différentes migrations de chacun des ADN obtenus par RT-PCR.

- Clonage des gènes

- Extraction des ADN amplifiés à partir du gel d'agarose

Le kit utilisé est Nuleospin ND extract II (Machery Magel)

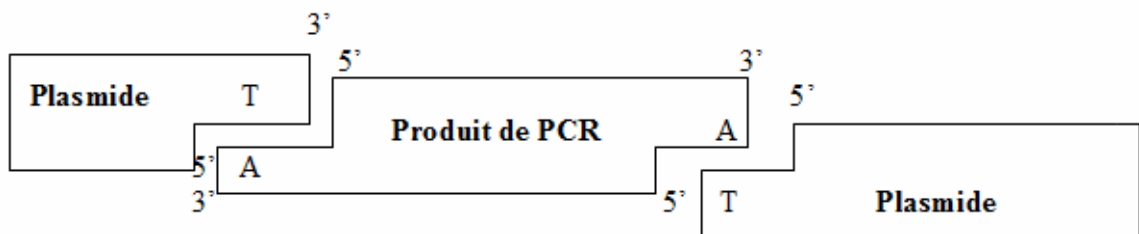
- on découpe les bandes issues de la migration des produits de RT-PCR
- pour 100 g d'agarose on ajoute 200 μL de tampon NT pour dissoudre le gel ; le tout est mis à incuber 15 min à 50°C
- le tout est déposé sur une colonne de filtration placée sur une tube puis est centrifugé 1 min à 11 000 t/min ; le filtrat est jeté.
- 600 μL de tampon NT3 sont déposés sur la colonne ; le tout est centrifugé 3 min à 11 000 t/min.
- 20 μL d'eau stérile sont déposés pour l'élution ; après une centrifugation de 2 minutes à 11 000 t/min, la colonne est jetée et on récupère les 20 μL de solution d'ADN purifié.

- Ligation

Le kit utilisé est « TA cloning kit » (In Vitrogen). On insère l'ADN purifié au sein d'un plasmide commercial appelé PCR2.1. 6 μL d'ADN sont ajoutés à une solution contenant 2 μL de plasmide PCR2.1 (3900 paires de bases), 1 μL d'enzyme (ligase) et 1 μL de tampon 10X.

La technique de clonage est appelée « TA cloning » en ce sens que l'enzyme de ligation va d'une part reconnaître des bases azotées T du plasmide qu'elle va liguer aux bases azotées A situées en 3' du produit de RT-PCR ; ceci permet de lier le produit de RT-PCR au plasmide. La réaction de ligation est obtenue après incubation une nuit à 14°C.

Figure 11 : Principe du « TA cloning »



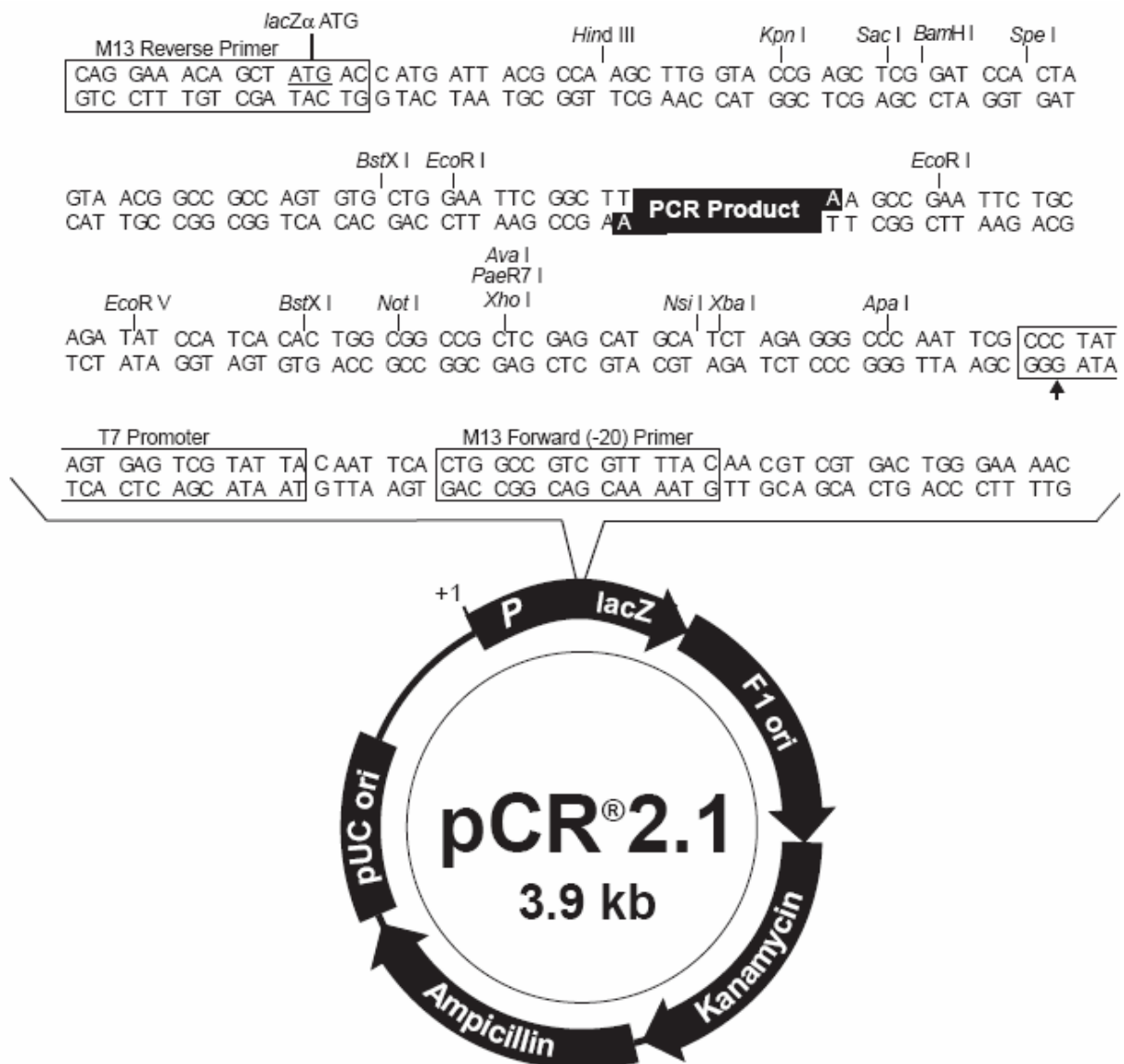
- Transformation bactérienne

Les 10 µL d'ADN plasmidique sont ajoutés à 50µL de solution de bactéries DH5α ND (Life Technologies). Le tout est mis à incuber 30 min dans la glace puis est soumis à un choc thermique à 37°C pendant 20 secondes. 300 µL de milieu SOC sont ajoutés et le tout est mis sous agitation pendant 1H à 37°C. La culture est ensuite transférée sur boîte de gélose contenant de l'ampicilline et 14 µL de X-GAL afin de réaliser une double sélection.

En effet au sein du plasmide PCR2.1 on retrouve le gène qui confère la résistance à l'ampicilline et un gène LactZ qui code pour une galactosidase ; cette enzyme clive le X-GAL qui apparaît ainsi de couleur bleue. Le produit de RT-PCR étant inséré au sein du cadre de lecture du gène Lact-Z au cours de la ligation, les bactéries transformées avec du plasmide ligué ne se coloreront pas en bleu en présence de X-GAL vue qu'elles n'exprimeront pas l'enzyme nécessaire. Ainsi les colonies bactériennes qui nous intéressent sont blanches : elles comportent le plasmide avec le produit de RT-PCR inséré.

Figure 12 : Cartographie du plasmide PCR2.1

Source : www.invitrogen.com



Quatre colonies blanches sont prélevées au hasard et mises chacune en culture liquide dans du milieu LB spécifique puis agitées une nuit à 37°C. On obtient ainsi quatre clones pour chaque échantillon de départ.

- Purification de l'ADN plasmidique (kit Nucleospin)

Chaque clone est centrifugé 1 min à 11000 t/min puis on élimine le surnageant. Les bactéries restent au fond du tube.

La lyse bactérienne est obtenue en ajoutant successivement 250µL de trois tampons spécifiques, A1, A2 et A3. Le tout est centrifugé 10 min à 11000 t/min, le surnageant est récupéré sur une membrane de silicium et le tout est centrifugé 1 min à 11000t/min.

Le filtrat est éliminé et 450µL de tampon A4 sont ajoutés sur la membrane ; après centrifugation 1 min à 11000 t/min, le surnageant est jeté.

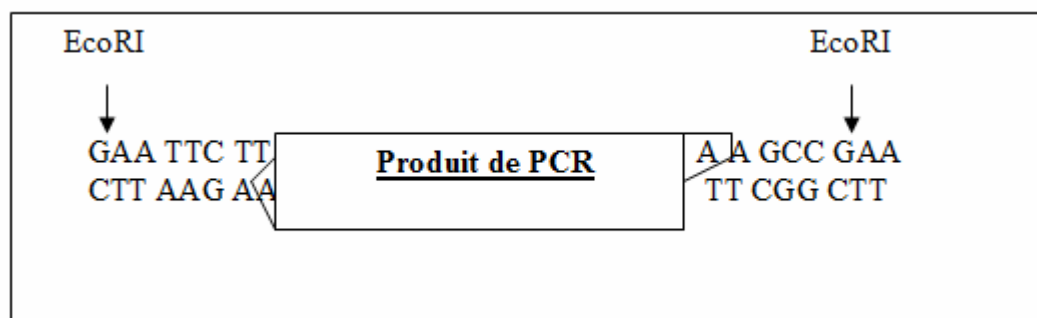
50µL d'eau sont ajoutés sur la colonne pour l'élution. On centrifuge 1 min à 11000 t/min est on récupère le filtrat.

On récupère ainsi une solution d'ADN plasmidique purifié.

- Analyse des produits par digestion par une enzyme de restriction

Cette digestion enzymatique permet de vérifier que les ADN plasmidiques purifiés comprennent bien le produit de RT-PCR d'intérêt. Pour ce faire on mélange 3 µL d'ADN plasmidique avec 1 µL d'enzyme de restriction EcoRI et 2µL de son tampon spécifique. On complète à 20 µL avec 14µL d'eau. Le tout est incubé 2H à 37 °C. L'enzyme EcoRI reconnaît deux régions spécifiques du plasmide juste en amont et en aval du produit de RT-PCR clonés ; ainsi les produits de digestion attendus ont la même taille que le produit de RT-PCR.

Figure 13 : Site de clivage de l'enzyme EcoRI sur le plasmide PCR2.1



On fait migrer les produits de digestion sur un gel d'agarose à 2% pendant 45 min avec un générateur appliquant une tension de 70mV avec une intensité de 200mA. Si la taille des bandes correspond à la taille attendue on peut conclure que le clonage du produit de RT-PCR a bien eu lieu.

- Séquençage et analyse phylogénétique

Les produits de RT-PCR dont le clonage n'a pas eu lieu sont envoyés directement à séquencer.

Les produits issus du clonage sont également envoyés à séquencer. Le séquençage est réalisé à partir du couple de amorces M13 rev et for pour le gène M et pour le gène N. Elles s'hybrident sur le plasmide en amont et en aval du gène cloné et dont les séquences suivent :

- o M13 for CTG GCC GTC GTT TAA C
- o M13 rev CAG GAA ACA GCT ATG AC

Les séquences reçues sont analysées à l'aide du site «European bioinformatic institute», à l'adresse www.ebi.ac.uk. Elles sont traduites en protéines (logiciel « Transeq ») et alignées avec les séquences de notre base de données qui rassemble la majorité des séquences génétiques des *Coronavirus* félins, canins et porcs (logiciel « Clustal W »).

5. Tests statistiques

- Test du χ^2_c (corrigé) (Yates)

Etant donné qu'un des effectifs théoriques est inférieur à 5, on applique au test du χ^2 la correction de Yates qui consiste à retrancher 0,5 à chaque différence absolue (effectif observé – effectif théorique) avant de l'élever au carré.

$$\chi^2_{c\ 1\ ddl} (p < 0,05) = \sum ((|\text{Observés} - \text{calculés}| - 0,5)^2 / \text{calculés})$$

$\chi^2_{c\ 1\ ddl} (p < 0,05) = 3,84$ signifie qu'il y a moins 5 % de chance que la différence soit due au hasard.

1 ddl : degré de liberté = 1

- Test de concordance

Ce test permet le calcul de la valeur Kappa (κ).

κ représente l'écart des mesures obtenues par rapport aux valeurs calculées dans le cadre d'une distribution « idéale », valeurs indépendantes sur le plan statistique.

κ peut varier entre -1 et 1.

Si $\kappa > 0,75$ il y a concordance statistique entre les deux types de mesure.

$$\kappa = (Co - Ca) / (1 - Ca)$$

Co : pourcentage de concordance observée

Ca : pourcentage de concordance attendue

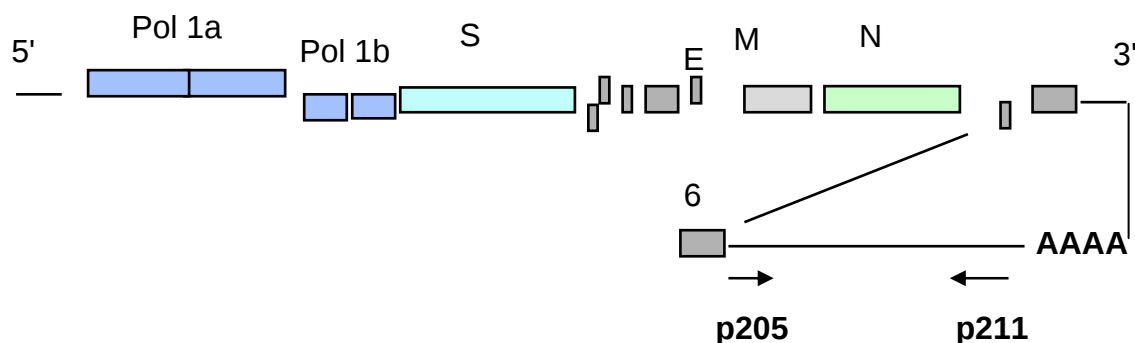
II. Résultats des deux études

1. Etude du taux de prévalence des infections à *Coronavirus* chez des chats de particuliers asymptomatiques dans une clinique de la région parisienne

En 2004, au sein d'une clinique située en région parisienne, 68 chats appartenant à des particuliers et en bonne santé ont été présentés en clinique pour leur stérilisation ; ils ont ainsi subi une anesthésie générale qui nous a permis de réaliser plus facilement nos prélèvements : une prise de sang et un écouvillonnage rectal (avec le consentement éclairé des propriétaires).

Les techniques utilisées sont détaillées dans le chapitre « matériel et méthode ». La sérologie est déterminée par immunofluorescence indirecte ; la RT-PCR amplifie la séquence consensus, commune à tous les *Coronavirus* du groupe 1. C'est une région peu variable au sein des *Coronavirus* du groupe 1, ce qui nous permet de rechercher la présence de *Coronavirus*. Cette méthode est donc très sensible mais peu spécifique des *Coronavirus* félins (22).

Figure 14 : Principe de la RT-PCR amplifiant la séquence consensus



Les résultats sont regroupés dans le tableau qui suit. Les numéros correspondent à l'ordre d'arrivée des prélèvements au laboratoire de virologie de l'école vétérinaire d'Alfort. Les numéros absents correspondent à des chats que nous n'avons pas pu garder pour notre étude étant donné que les trois prélèvements n'avaient pas pu être réalisés sur eux.

« P » signifie positif et « N » négatif. Pour les sérologies, il est indiqué jusqu'à quelle dilution le résultat reste positif (voir matériel et méthodes) : par exemple, P au 625 signifie que l'on détecte des anticorps viraux avec une solution d'anticorps diluée au 1/625.

Tableau 3: Résultats des sérologies et RT-PCR sur les chats de particuliers en bonne santé

n° du chat	Age (en années)	Sexe	Sérologie	RT-PCR sur sang	RT-PCR sur selles
50	1	M	N	N	N
53	2	M	N	N	N
54	1	M	N	N	N
55	1	M	N	N	N
56	1	M	N	N	N
57	1	M	P au 625	N	P
58	1	M	N	N	N
59	1	F	N	N	N
60	1	M	P au 625	N	P
61	1	M	P au 3125	N	P
62	1	M	N	N	N
63	1	M	N	N	N
65	1	M	N	N	N
66	4	M	N	N	N
67	1	F	N	N	N
69	3	M	N	N	N
70	2	M	N	N	N
71	1	M	N	N	N
72	1	F	N	N	N
73	2	M	N	N	N
76	1	M	N	N	N
77	1	M	N	N	N
78	1	M	N	N	N
79	2	F	N	N	N
85	1	F	N	N	N
86	1	M	N	N	N
87	1	M	P au 625	N	N
88	1	F	N	P	N
89	1	M	P au 3125	N	P
93	1	M	N	N	N
94	3	M	N	N	N
95	8	F	N	N	N
99	8	M	N	N	N
100	1	F	N	N	N
108	8	M	N	N	N
111	1	M	N	N	N
112	11	M	N	N	N
113	15	M	N	P	N
114	1	M	N	N	N
115	1	M	N	N	N
116	2	M	N	N	P
119	1	F	N	N	N
120	1	M	N	N	N
122	1	F	N	N	N
123	1	F	P au 16000	N	N
124	1	M	N	N	N

125	1	F	P au 125	N	P
126	1	M	N	N	N
127	1	F	N	P	N
130	1	M	P au 625	N	P
131	2	M	N	N	N
132	1	F	N	N	N
133	2,5	M	N	N	N
134	1	M	N	N	N
135	1	M	N	N	N
139	5	M	P au 625	N	P
140	1	M	N	N	N
144	1	M	N	P	N
146	2	F	N	N	N
147	1	F	N	N	N
148	1	F	N	N	N
149	1	F	P au 3125	N	P
150	1	F	N	N	N
151	14	M	N	N	N
154	8	F	N	N	N
155	1	F	N	N	N
156	10	M	N	N	N
157	10	F	P au 125	N	N

- Résultats des différents tests

- o Excrétion fécale

13% des chats sont excréteurs de *Coronavirus* dans leurs fécès.

- o Virémie

4 chats, soit 6%, sont virémiques.

- o Séro-prévalence

16% des chats ont une sérologie positive.

- Etude de la concordance entre les différents tests

Les chats virémiques ne sont tous ni excréteurs ni séropositifs pour les *Coronavirus*.

2/3 des chats séropositifs sont aussi excréteurs de *Coronavirus* dans leurs selles. 90% des chats excréteurs sont séropositifs.

Nous avons réalisé le calcul du coefficient de concordance « kappa » (noté κ) afin de quantifier la corrélation entre ces différents tests.

- o Concordance entre RT-PCR sur sang et sérologie

Tableau 4: Répartition des effectifs selon les résultats de la sérologie et de la RT-PCR sur sang

	RT-PCR sang >0	RT-PCR sang <0	Total
Sérologie >0	0	11	11
Sérologie <0	4	53	57
Total	4	64	68

$$\kappa = -0,089 < 0,75$$

Il n'y a donc pas de concordance statistiquement significative entre la RT-PCR sur sang et la sérologie.

- o Concordance entre RT-PCR sur sang et RT-PCR sur selles

Tableau 5: Répartition des effectifs selon les résultats aux RT-PCR sur selles et aux RT-PCR sur sang

	RT-PCR selles >0	RT-PCR selles <0	Total
RT-PCR sang >0	0	4	4
RT-PCR sang <0	9	55	64
Total	9	59	68

$$Ca = 0,824 \text{ et } Co = 0,809$$

$$\kappa = -0,085 < 0,75$$

Il n'y a donc pas de concordance statistiquement significative entre la RT-PCR sur sang et la sérologie.

- o Concordance entre RT-PCR sur selles et sérologie

	RT-PCR selles >0	RT-PCR selles <0	Total
Sérologie >0	8	3	11
Sérologie <0	1	56	57
Total	9	59	68

Tableau 6: Répartition des effectifs selon les résultats aux RT-PCR sur selles et aux sérologies

$$Ca = 0,749 \text{ et } Co = 0,941$$

$$\kappa = 0,765 > 0,75$$

Il y a donc une **concordance statistiquement significative entre la RT-PCR sur selles et la sérologie**.

- Recherche d'une association statistique entre le sexe du chat et l'excrétion virale

On utilise le test du χ^2_c (Yates).

Tableau 7 : Effectifs observés dans les deux sexes et effectifs calculés correspondant

	Animaux excréteurs	Animaux non excréteurs	Total
Mâles	7 (6)	40 (41)	47
Femelles	2 (3)	19 (18)	21
Total	9	59	68

$$\chi^2_{c \ 1 \ ddf} (p < 0,05) = 0,14 < 3,84 .$$

Ainsi l'écart observé entre les mâles et les femelles n'est pas significatif (au seuil de 5%). Il n'y a donc pas d'association statistique positive entre l'excrétion virale et le sexe de l'animal en ce qui concerne les chats de cette étude.

- Recherche d'une association statistique entre l'âge du chat et l'excrétion virale

On réalise le même le test du χ^2_c (Yates).

Tableau 8 : Effectifs observés dans les deux tranches d'âge et effectifs calculés correspondant

	Animaux excréteurs	Animaux non excréteurs	Total
Age < 1,5 an	7 (6)	40 (41)	47
Age > 1,5 an	2 (3)	19 (18)	21
Total	9	59	68

$\chi^2_{c \ 1 \ ddf} (p < 0,05) = 0,14 < 3,84$; il n'y a donc pas d'association statistique entre excrétion virale et l'âge du chat en ce qui concerne les chats de cette étude.

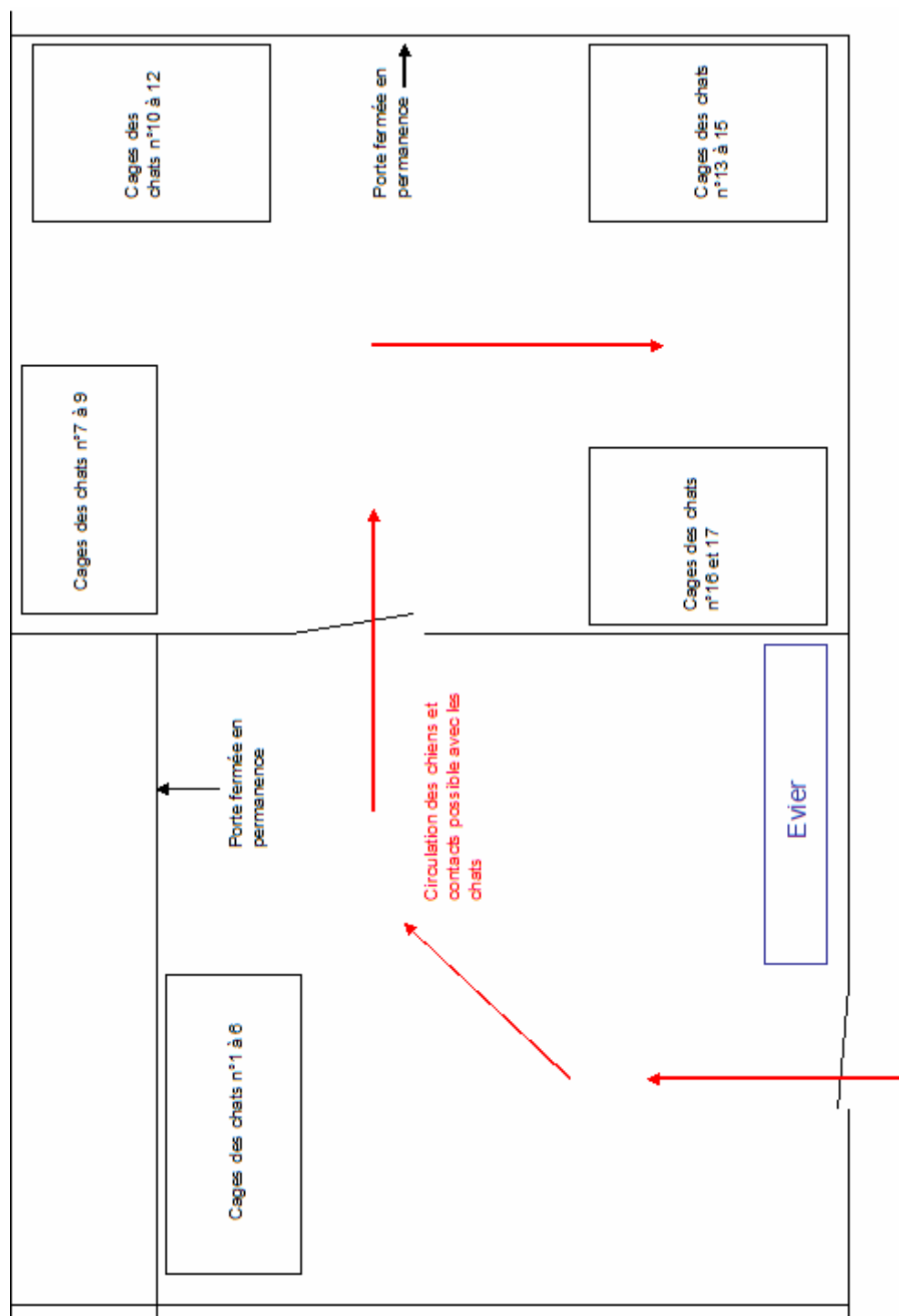
2. Etude de la circulation virale de *Coronavirus* entre chiens et chats en bonne santé en contact au sein d'une SPA

Cette étude porte sur 7 chiens et 17 chats vivant dans la même SPA (Vaux le pénil). Les chats sont dans des cages individuelles où ils peuvent être en contact avec les chiens n°11, 19, 20 et 21. Les chiens **n°22, 23 et 24 n'ont pas accès à la chatterie.**

L'étude précédente a montré que la RT-PCR sur selles avait une bonne sensibilité et que les animaux excréteurs étaient très souvent séropositifs; nous nous sommes donc restreint à prélever uniquement les fécès des animaux, sans réaliser de prise de sang.

La figure suivante montre la disposition des animaux au sein de la chatterie de la SPA et résume les différentes possibilités de circulation des chiens.

Figure 15 : Plan de la SPA de Vaux le Pénil



NB : seuls les chiens n°11, 19, 20 et 21 circulent librement comme indiqué sur le schéma

- Résultats des RT-PCR

Nous avons d'abord souhaité déterminer si les animaux prélevés étaient excréteurs de *Coronavirus*. Nous avons donc réalisé la RT-PCR sur la séquence consensus comme dans l'étude précédente.

Dans les tableaux qui suivent, « P » signifie positif et « N » négatif. « CT » signifie chat et « CN » signifie chien.

- o Séquence consensus

13 chats sur 17 (soit 76%) sont excréteurs de *Coronavirus*. Tous les chiens prélevés sont excréteurs de *Coronavirus*.

Tableau 9 : Résultats des RT-PCR sur la séquence consensus pour les chats et les chiens

	n°des échantillons	RT - PCR séquence consensus
CT	1	P
CT	2	N
CT	3	P
CT	4	P
CT	5	P
CT	6	P
CT	7	P
CT	8	P
CT	9	P
CT	10	N
CN	11	P
CT	12	P
CT	13	P
CT	14	P
CT	15	P
CT	16	N
CT	17	P
CT	18	N
CN	19	P
CN	20	P
CN	21	P
CN	22	P
CN	23	P
CN	24	P

o Gènes M et N

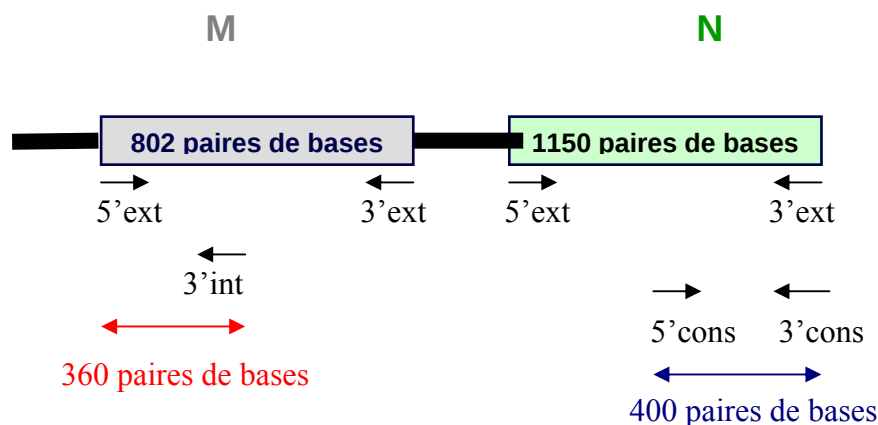
Afin de mieux caractériser les souches virales circulant chez ces animaux et de différencier les souches de FCEV des souches de CCV, nous avons étudié les séquences des gènes M et N. La RT-PCR était la méthode de choix pour amplifier ces gènes avant de les cloner et de les séquencer.

Les RT-PCR sur les gènes M et N, ont été réalisées à partir de tous les échantillons (et pas seulement à partir de ceux qui donnent un résultat positif sur la séquence consensus) pour éviter de passer à côté des faux négatifs (on ne connaît pas la sensibilité de la première RT-PCR).

Pour le gène M, les amorces utilisés en première intention ont été 5'ext et 3'ext : elles nous ont permis d'amplifier le gène M en entier ; sa taille est de 802 paires de bases. En cas d'échec, nous avons effectué une RT-PCR avec les amorces 5'ext et 3'int qui ne permettent d'amplifier qu'un fragment du gène M (sa taille est de 360 paires de bases).

Pour le gène N les amorces utilisées en première intention ont été 5'ext et 3'ext : elles nous ont permis d'amplifier le gène N en entier (sa taille est de 1150 paires de bases). En cas d'échec avec les amorces précédentes, nous avons utilisé les amorces 5'cons et 3'cons qui permettent d'amplifier un fragment du gène N (sa taille est de 400 paires de bases).

Figure 16 : Localisation des amorces utilisées et tailles des fragments amplifiés lors des RT-PCR sur les gènes M et N



- Gène M
 - o Echantillons issus de chats

Tableau 10: Résultats des RT-PCR sur le gène M pour les chats et les chiens

n°des échantillons	1 : RTPCR gène M amorces 5'ext et 3'ext	2 : RTPCR gène M amorces 5'ext et 3'int	1+2
1	P	non réalisé	P
2	N	N	N
3	P	non réalisé	P
4	N	P	P
5	N	P	P
6	N	P	P
7	N	P	P
8	N	P	P
9	N	P	P
10	N	N	N
12	N	P	P
13	N	N	N
14	N	P	P
15	P	non réalisé	P
16	N	P	P
17	P	non réalisé	P
18	N	P	P

- o Echantillons issus de chiens

Tableau 11: Résultats des RT-PCR sur le gène M pour les chats

n° des échantillons	1 : RTPCR gène M amorces 5'ext et 3'ext	2 : RTPCR gène M amorces 5'ext et 3'int	1+2
11	N	P	P
19	P	non réalisé	P
20	N	P	P
21	N	P	P
22	N	P	P
23	N	P	P
24	N	P	P

Le gène M a pu être amplifié en entier pour les échantillons n°1, 3, 15, 17 (4 chats) et n°19 (un chien).

Avec les amorces 5'ext et 3'int, d'avantage d'échantillons donnent un résultat positif, à savoir les n° 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 16 et 18 (soit 10 chats) et 11, 20, 21, 22, 23 et 24 (soit 6 chiens) ; le fragment amplifié est plus petit (360 paires de bases contre 802 avec le couple d'amorces précédentes) mais la méthode semble plus sensible vue qu'elle a permis d'amplifier une partie du gène M à partir d'échantillons qui donnaient à priori un résultat négatif (16 et 18) lors de la RT-PCR sur la séquence consensus.

- Gène N

- o Echantillons issus de chats

Tableau 12: *Résultats des RT-PCR sur le gène N pour les chats*

n° des échantillons	1 :RTPCR gène N primers 5' ext et 3' ext	2 :RTPCR gène N primers 5'cons et 3'cons	1+2
1	N	N	N
2	N	N	N
3	P	non réalisé	P
4	N	N	N
5	N	P	P
6	N	P	P
7	P	non réalisé	P
8	N	P	P
9	N	N	N
10	N	N	N
12	P	non réalisé	P
13	N	N	N
14	N	N	N
15	N	P	P
16	N	P	P
17	P	non réalisé	P
18	N	P	P

o Echantillons issus de chiens

Tableau 13: Résultats des RT-PCR sur le gène N pour les chiens

n° des échantillons	1 : RTPCR gène N primers 5' ext et 3' ext	2 : RTPCR gène N primers 5'cons et 3'cons	1+2
11	N	N	N
19	P	non réalisé	P
20	N	N	N
21	N	P	P
22	P	non réalisé	P
23	P	non réalisé	P
24	P	non réalisé	P

Le gène N a été amplifié en entier à partir des échantillons n°3, 7, 12, 17 (4 chats) et 19, 22, 23 et 24 (4 chiens) avec les amorces 5'ext et 3'ext.

Pour les échantillons 5, 6, 8, 15, 16, 18 (6 chats) et 21 (un chien) on a pu amplifier une partie du gène N avec les amorces 5'cons et 3'cons. Cette RT-PCR semble plus sensible vu qu'elle a permis d'amplifier les gènes N à partir d'échantillons ayant donné un résultat négatif sur la séquence consensus (n°16 et 18). Toutefois nous n'avons pas réussi à amplifier le gène N à partir de l'échantillon n°20 qui avait pourtant donné un résultat positif pour la séquence consensus.

- Synthèse des résultats

Tableau 14: Synthèse des résultats des RT-PCR sur les gènes M et N pour les chats et les chiens quelque soit la taille du fragment amplifié.

n° des échantillons	RT-PCR Gène M	RT-PCR Gène N
1 (CT)	P	N
2 (CT)	N	N
3 (CT)	P	P
4 (CT)	P	N
5 (CT)	P	P
6 (CT)	P	P
7 (CT)	P	P
8 (CT)	P	P
9 (CT)	P	N
10 (CT)	N	N
11 (CN)	P	N
12 (CT)	P	P
13 (CT)	N	N
14 (CT)	P	N
15 (CT)	P	P
16 (CT)	P	P
17 (CT)	P	P
18 (CT)	P	P
19 (CN)	P	P
20 (CN)	P	N
21 (CN)	P	P
22 (CN)	P	P
23 (CN)	P	P
24 (CN)	P	P

Remarque : l'échantillon n°13 est le seul positif sur la séquence consensus pour lequel nous n'avons pu amplifier ni le gène M ni le gène N.

- Résultats des clonages

En vue du séquençage des gènes M et N nous avons souhaité cloner les produits de RT-PCR par une technique de « TA cloning » (voir matériel et méthodes).

La réussite du clonage est évaluée par l'obtention de séquences ayant pu être analysées.

Le gène M a pu être cloné :

- en entier à partir des échantillons 1, 3, 15 et 17
- en partie (RT-PCR avec les amorces 5'ext et 3'int) à partir des échantillons 4, 6, 8, et 22

Le gène N a pu être cloné en entier pour les échantillons 3, 7, 12, 17 et 19.

Les autres produits de RT-PCR, pour lesquels le clonage n'a pas été possible, ont été envoyés directement à séquencer (par « Génome Express », une entreprise extérieure) avec les amorces ayant permis leur amplification.

- Résultats des analyses de séquences

Les séquençages ont été réalisés par la même entreprise, « Génome Express ».

Les séquences analysées ont été comparées à des souches types de FECV (les souches 79-1146, 79-1683 et UCD1), CCV (23/03 et BGF10) et TGEV. Ceci a été réalisé grâce aux logiciels du site «european bioinformatic institut», à l'adresse www.ebi.ac.uk.

- o Pour le gène M

- Echantillons issus de chats

L'analyse génétique des séquences montre que les 14 échantillons issus de chat et ayant donné des résultats positifs se répartissent en deux groupes. Le premier groupe rassemble les échantillons 1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 16, 17 et 18, dont les séquences se révèlent être plus proches des souches de FECV classiques que des séquences de CCV ou de TGEV. Le deuxième groupe rassemble les échantillons 4 et 8, dont les séquences isolées sont plus proches du CCV et du TGEV que du FECV.

L'alignement des séquences nucléotidiques montre que pour les séquences du gène M issues des échantillons 1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 16, 17 et 18, on retrouve 88 à 96 % d'homologie avec les séquences de FECV classiques contre 62 à 82 % et 77 à 89 % d'homologie avec respectivement les séquences de CCV et de TGEV classiques.

Les séquences du gène M des chats 4 et 8 ont 83 à 86 % et 97 à 98% d'homologie avec respectivement les séquences de CCV et de TGEV classiques ; contre seulement 78 à 81 % d'homologie avec les séquences de FECV classiques.

- Echantillons issus de chiens

Au vu des analyses on distingue deux types de *Coronavirus* chez les chiens étudiés :

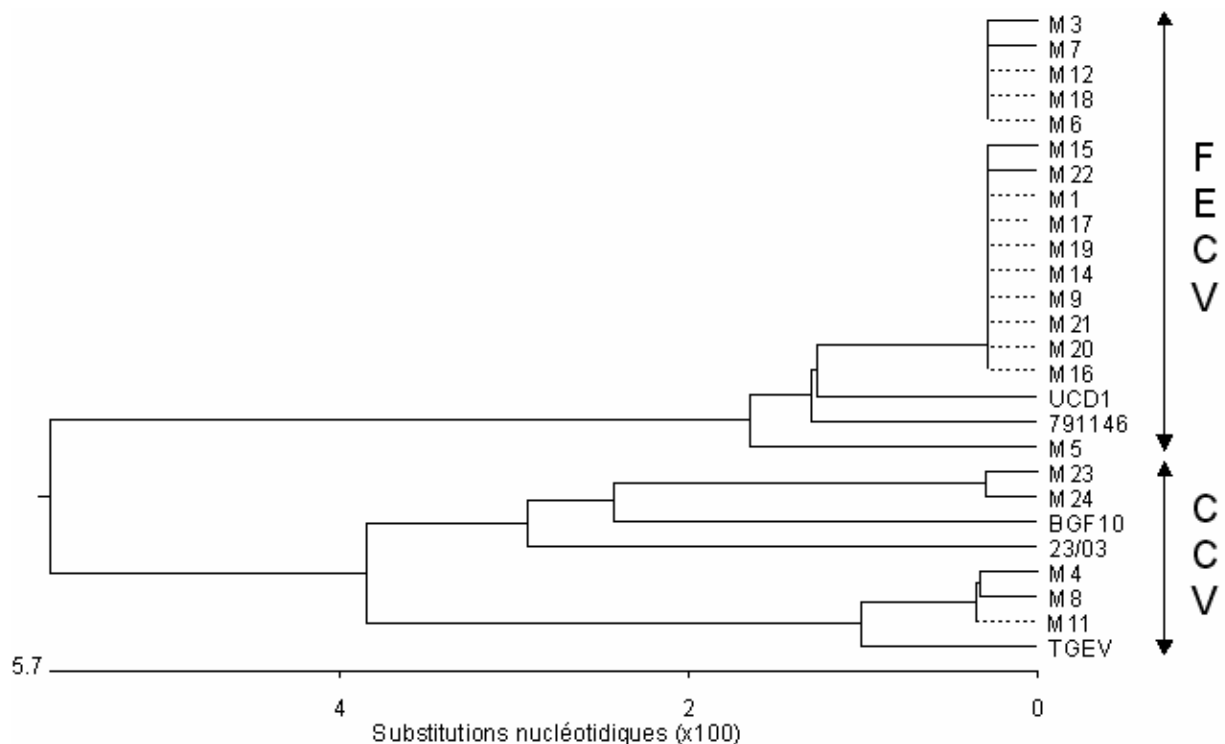
- ceux dont on a isolé une séquence de *Coronavirus* proche du CCV classique ; ce sont les chiens 11, 23 et 24.
- ceux dont on a isolé une séquence de *Coronavirus* plus proche du FECV que du CCV ; ce sont les chiens 19, 20, 21 et 22 ;

Remarque : les chiens n° 22, 23 et 24 n'ont pas accès à la chatterie.

L'alignement des séquences nucléotidiques montre que les séquences du gène M des chiens 11, 23 et 24 ont 83 à 86 % et 89 à 97 % d'homologie avec respectivement les séquences de CCV et de TGEV classiques contre 78 à 84 % d'homologie avec les séquences de FECV classiques.

En revanche les séquences issues des chiens 19, 20, 21 et 22 ont 88 à 92 % d'homologie avec les séquences de FECV classiques et seulement 76 à 82 % d'homologie avec les séquences de CCV et de TGEV classiques.

Figure 17: Arbre phylogénétique regroupant les différentes séquences du gène M obtenues à partir des échantillons de chats (M1, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M12, M14, M15, M16, M17 et M18) et des échantillons de chien (M11, M19, M20, M21, M22, M23 et M24) comparaison avec les souches disponibles dans les banques de donnée (BGF 10 et 23/03 pour les souches de type CCV, UCD1 et 79-1146 pour les souches de type FECV et TGEV pour les souches porcines).



- o Pour le gène N

- Echantillons issus de chats

Les analyses qui suivent démontrent l'existence de deux types de séquences différentes, la première rassemblant les échantillons 3, 5, 7, 15, 16 et 18 dont les séquences isolées sont plus proches du FECV classique ; la deuxième qui rassemble les échantillons 6, 8, 12, et 17 dont les séquences isolées s'avèrent être plus proches du CCV et du TGEV que du FECV.

L'alignement des séquences nucléotidiques montre que pour la séquence du gène N des chats n°3, 5, 7, 15, 16 et 18, on retrouve 87 à 94% d'homologie avec les séquences de FECV classique (79-1683, 79-1146 et UCD1) contre 66 à 77% avec les séquences de CCV classiques et 64 à 77% avec le TGEV.

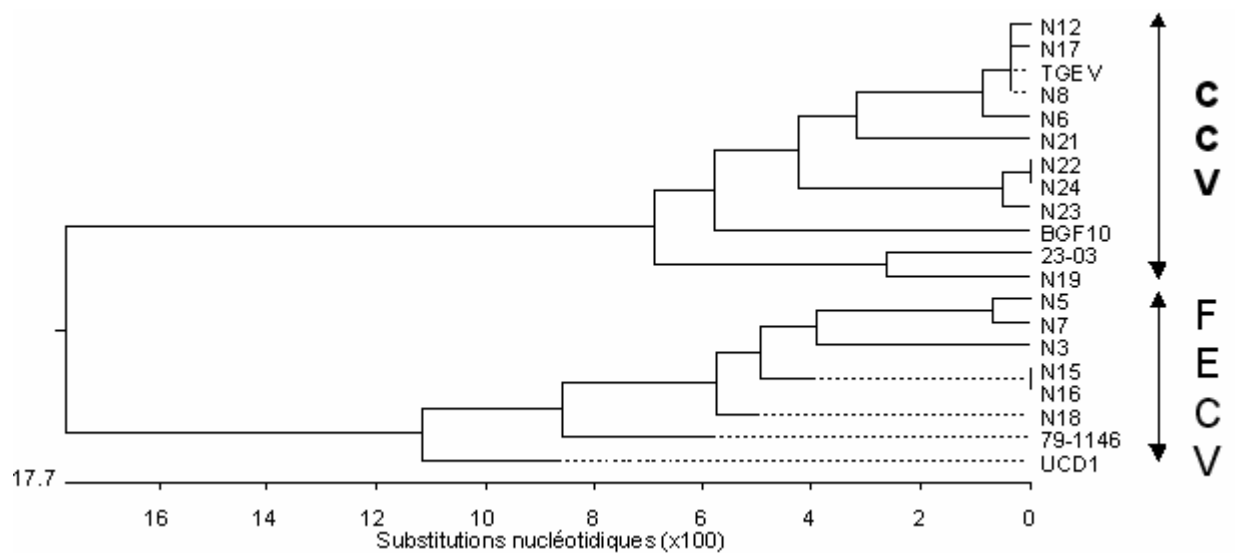
Concernant les échantillons 6, 8, 12, et 17, on retrouve bien plus d'homologie avec les séquences de CCV classiques, soit 85 à 89% contre 73 à 78 % avec les séquences de FECV. Pour ces chats la séquence du gène N est même plus proche de celle du TGEV avec 85% d'homologie pour l'échantillon 12 et 98 à 99% d'homologie pour les autres chats.

- Echantillons issus de chiens

Les séquences analysées sont toutes proches du CCV.

Lors de l'alignement des séquences nucléotidiques concernant les séquences du gène N issues des échantillons 19, 21, 22, 23 et 24, on retrouve 84 à 94% d'homologie avec les séquences de CCV classique, 87 à 94% avec le TGEV et 76 à 78% avec les FECV.

Figure 18: Arbre phylogénétique regroupant les différentes séquences du gène N obtenues à partir des échantillons de chats (N3, N5, N6, N7, N8, N12, N15, N16, N17 et N18) et des échantillons de chien (N11, N19, N21, N22, N23 et N24) comparaison avec les souches disponibles dans les banques de donnée (BGF 10 et 23/03 pour les souches de type CCV, UCD1 79-1183 et 79-1146 pour les souches de type FECV et TGEV pour les souches porcines).



- Bilan

En faisant le bilan de l'analyse phylogénétique portant sur les gènes M et N, on trouve plusieurs cas de figure concernant les chats :

- des souches plus proches du FECV classiques sur M et N isolées sur les chats n° 3, 5, 7, 15, 16 et 18 ;
- des souches plus proches du FECV classiques sur M et dont la séquence de N n'a pas été déterminée, isolées à partir des chats n°1, 9 et 14 ;
- une souche plus proche du CCV et du TGEV sur M et N isolés sur le chat n°8 ;
- des souches plus proches du FECV classiques sur M et plus proches du CCV et du TGEV pour le gène N isolées à partir des chats n° 6, 12 et 17 ;
- une souche plus proche du CCV et du TGEV sur M et dont la séquence de N n'a pas été déterminée, isolées à partir du chat n°4 ;

En ce qui concerne les chiens on trouve :

- des souches plus proches du CCV et du TGEV sur M et N isolés sur les chiens n° 23 et 24 ;
- des souches plus proches du FECV classiques sur M et plus proches du CCV et du TGEV sur N isolées à partir des chiens n° 19, 21 et 22 ;
- une souche plus proche du CCV et du TGEV sur M et dont la séquence de N n'a pas été déterminée, isolées à partir du chien n°11.

Tableau 15: Synthèse des résultats de l'analyse phylogénétique

	<u>gène M</u> <u>du type FECV</u>	<u>gène M</u> <u>du type CCV</u>	<u>gène N</u> <u>du type FECV</u>	<u>gène N</u> <u>du type CCV</u>
<u>souches isolées</u> <u>d'un chat</u>	n° 1, 3, 5, 6, 7, 9, 12,14, 15, 16, 17 et 18	n° 4 et 8	n° 3, 5, 7, 15, 16 et 18	n°6, 8, 12 et 17
<u>souches isolées</u> <u>d'un chien</u>	n° 19, 20, 21 et 22	n° 11, 23 et 24		n° 19, 21, 22, 23 et 24

III. Discussion

1. Etude du taux d'infection à *Coronavirus* chez les chats vivant chez des particuliers dans une clinique de la région parisienne en 2004

Nous avons pour objectif de développer une méthode de RT-PCR appliquée aux *Coronavirus* du groupe 1 au sein du laboratoire de virologie de l'ENVA, dans le but de détecter les animaux infectés et d'étudier le taux d'infection dues aux *Coronavirus* chez les chats de particuliers au sein d'une clinique de la région parisienne en 2004. Nous avons utilisé des amorces déjà décrites dans la littérature (21) qui ne sont pas spécifiques des *Coronavirus* félins mais permettent d'amplifier une séquence très conservée au sein des *Coronavirus* du groupe 1. La séquence amplifiée est appelée séquence consensus.

Il s'est avéré que 13% des animaux de l'étude étaient excréteurs en *Coronavirus* et que 16% possédaient des anticorps dirigés contre les *Coronavirus*.

Notre test de référence était auparavant la sérologie par immunofluorescence indirecte. Or les résultats obtenus avec la RT-PCR sur selles ont concordé significativement avec les résultats obtenus par la méthode sérologique ($\kappa > 0,75$) ; ainsi nous avons pu garder la RT-PCR sur selles pour notre deuxième étude (sur la circulation virale).

En revanche la RT-PCR sur sang n'a pas donné de résultats concordants avec ceux de la sérologie, ni même avec ceux de la RT-PCR sur selles (κ proche de 0 pour les deux tests de concordance). De plus seuls 6% des chats testés se sont avérés virémiques et aucun n'a été testé positif pour les deux autres tests. L'hypothèse la plus plausible pouvant expliquer cette observation serait que les chats concernés seraient en tout début d'infection : ils connaîtraient une première période de virémie, transitoire et non associée à une réponse immunitaire ni à une excrétion virale fécale.

Nous n'avons pas été en mesure de pouvoir vérifier cette hypothèse car il n'a pas été possible de faire revenir les chats virémiques à la clinique.

La RT-PCR sur selles est très spécifique des infections à *Coronavirus* du groupe 1 mais elle ne l'est pas pour les *Coronavirus* félins ; de plus aucune étude n'a permis de déterminer la sensibilité ou la spécificité de la sérologie par immunofluorescence indirecte qui était notre test de référence. Ainsi nous ne pouvons conclure qu'à un taux d'infection apparent, qui avoisinerait 13% (selon les résultats de la RT-PCR sur selles) et 16% (selon les résultats de la sérologie), pour les chats de particulier de cette clinique en 2004.

A l'échelle des populations testées, nous avons montré que le taux d'infection à *Coronavirus* chez les chats de particuliers était inférieur au taux de prévalence chez les chats vivant en collectivité (80 à 90% lors d'infections enzootiques). Cette information, bien que largement admise, n'avait pas encore été vérifiée sur le terrain.

Un autre biais de notre étude vient du fait que nous n'avons gardé que les chats pour lesquels la prise de sang et l'écouvillonnage rectal avaient été réalisés. Ainsi, 32% des chats, pour lesquels il n'avait été possible de réaliser que l'un des deux prélèvements, n'ont pas fait partie de l'étude ; on ne peut donc exclure un biais (involontaire) d'échantillonnage au sein de la population étudiée et donc un défaut de représentativité. Par ailleurs, cette étude ne peut donner lieu à quelque extrapolation que ce soit en dehors du contexte précis de cette clinique durant la période considérée.

Néanmoins, d'autres études plus complètes, intégrant un échantillonnage représentatif, pourraient bénéficier grâce à la présente étude :

- d'une base permettant de disposer d'un taux de prévalence supposé utilisable pour déterminer la taille optimale de l'échantillon afin qu'il donne un résultat précis ;
- de la possibilité de ne réaliser qu'un seul prélèvement, en l'occurrence un écouvillonnage rectal, plus facile à réaliser qu'une prise de sang.

2. Etude de la circulation virale au sein d'une SPA

Notre objectif était d'étudier les possibilités de transmission de *Coronavirus* entre chiens et chats au sein de la SPA, milieu confiné où les animaux inclus dans l'étude sont en contact permanents directs (museau à museau) et indirects via l'environnement.

Pour ce faire nous avons recherché les animaux porteurs de *Coronavirus* à partir d'écouvillons rectaux obtenus chez les animaux, avec une méthode de RT-PCR développée précédemment et ciblant la séquence consensus.

Il s'avère que tous les chiens et 76% des chats ont été positifs au vu de ce test. Ceci va dans le sens d'une circulation virale importante au sein de cet effectif. Nous avons poursuivi avec pour objectif de montrer une éventuelle transmission interspécifique de *Coronavirus*. Pour ce faire nous avons analysé une partie du génome des *Coronavirus* isolés à partir des animaux de l'étude, et en particulier les gènes M et N qui permettent une bonne discrimination des souches de type FCEV et CCV.

Nous avons séquencé les gènes N et M, soit à partir d'un clonage du gène, soit directement à partir des produits de RT-PCR réalisées sur ces gènes lorsque le clonage s'est avéré infructueux. Cette dernière méthode trouve une limite en ce sens qu'elle ne permet pas de mettre en évidence si l'animal est co-infecté par deux souches virales différentes. Or le clonage n'a pu être réalisé que pour 7 chats sur 13 et 1 chien sur 7 en ce qui concerne le gène M et pour 1 chien et 5 chats en ce qui concerne le gène N. Il serait donc intéressant d'aboutir au clonage des gènes M et N pour les autres animaux.

De plus il n'a pas toujours été possible d'amplifier les gènes N ou M en entier : cela n'a été possible que pour 4 chats (n° 1, 3, 15 et 17 pour le gène M ; n° 3, 7, 12 et 17 pour le gène N) et 4 chiens (n° 22, 23 et 24 pour le gène N et le n°19 pour les gènes M et N). Pour les autres échantillons seule une partie (1/3 de chacun des deux gènes) a été amplifiée. Ceci pourrait constituer une limite quant à la précision des alignements de séquences.

Nous avons choisi de ne pas amplifier le gène S, vu les difficultés décrites dans les dernières publications issues de la littérature pour le clonage de ce grand gène (4000 paires de bases).

Globalement la limite principale de notre étude est qu'elle ne porte pas sur la totalité du génome des *Coronavirus* analysés.

Notre étude met en évidence des séquences atypiques en ce qui concerne les gènes M et N ; isolées à partir de chats, certaines sont plus proches du CCV et du TGEV que du FECV. On peut même dire que phylogénétiquement elles sont apparentées à du TGEV ou du CCV. Nous avons également isolé à partir de chiens des séquences apparentées au FECV.

En ce qui concerne le gène N, 4 chats sur 13 se sont avérés excréteurs d'une séquence plus proche des *Coronavirus* canins (CCV) que des *Coronavirus* félins (FECV).

En ce qui concerne le gène M, 2 chats se sont avérés excréteurs d'une séquence plus proche des *Coronavirus* canins (CCV) que des *Coronavirus* félins (FECV) et 4 chiens se sont avérés excréteurs d'une séquence plus proche des *Coronavirus* félins que des *Coronavirus* canins.

La présence de séquences plus proches du FECV chez un des chiens à priori pas en contact avec les chats au sein de la SPA (chien n°22 avec une séquence du gène M plus proche du FECV que du CCV) pourrait s'expliquer par un contact antérieur avec un chat excréteur de *Coronavirus*, puis passage de barrière d'espèce.

Les données de la bibliographie montrent l'existence de souches atypiques de *Coronavirus*, notamment sur le gène M, avec par exemple la souche FCoV-57, isolée à partir d'un chat, et qui occupe une position intermédiaire entre les souches de type FECV et CCV au sein des *Coronavirus* (29), ainsi que la souche FCEV - like CCV isolée par Pratelli et al. à partir d'un chien et qui occupe également une position intermédiaire entre le FECV et le CCV (37). Ces résultats pourraient s'expliquer par l'existence de recombinaisons homologues entre FECV et CCV avec une transmission interspécifique préalable.

Toutefois aucune preuve d'une telle transmission n'a été fournie au vu des données actuelles de la littérature.

Nos résultats n'ont pas été décrits dans la littérature. En revanche, il a déjà été montré sur des chats suspects de PIF qu'une sérologie mettant en évidence les anticorps dirigés contre le TGEV était plus sensible qu'une sérologie mettant en évidence des anticorps anti-FCEV (25). En effet, certains sérums de chats ne réagissaient que pour le TGEV. Cette étude suggérait déjà que certains chats seraient infectés par des souches très proches phylogénétiquement du TGEV, ce qui coïnciderait avec nos résultats.

La mise en évidence de séquences atypiques de *Coronavirus*, isolées chez des chats ou des chiens, pourrait s'expliquer par l'existence de mutations et/ou de recombinaisons homologues entre des souches classiques de FECV et de CCV. La structure du génome des *Coronavirus* (virus à ARN) est un facteur favorisant l'apparition de mutations spontanées. D'autre part la coexistence de chats et de chiens en contact permanent au sein d'un milieu confiné a pu favoriser l'émergence de nouvelles souches par recombinaisons homologues. Cette hypothèse est d'autant plus probable que les FECV de sérotype 2 proviennent d'une double recombinaison homologue entre les souches de sérotype 1 et le *Coronavirus* canin. Elle mériterait d'être vérifiée par des travaux ultérieurs qui s'attacheraient à séquencer le génome complet de chaque souche virale présente sur l'animal prélevé.

L'existence de co-infections augmenterait les chances de recombinaison homologues entre des *Coronavirus* félins et canins et pourrait aussi expliquer nos résultats. D'autant plus que Pratelli et al. ont déjà démontré l'existence de co-infection par deux souches de *Coronavirus* canin (de type I et II) chez le chien (36).

Une limite de notre étude est que nous n'avons pas analysé différents clones issus de chaque échantillon ; cette méthode permettrait de mettre en évidence une co-infection d'un même animal par des souches de FECV et de CCV. Une RT-PCR spécifique aux *Coronavirus* félins d'une part et aux *Coronavirus* canins d'autre part serait une autre méthode à développer afin de mettre en évidence une co-infection chez un même animal.

CONCLUSION

Notre première étude a permis de détecter des animaux excréteurs par RT-PCR sur la séquence consensus, commune à tous les *Coronavirus* du groupe 1. 13% des chats appartenant à des particuliers sont excréteurs de *Coronavirus*. Nous avons montré que ce test concordait statistiquement avec notre test de référence, la sérologie par immunofluorescence indirecte. On ignore malheureusement la sensibilité et la spécificité de ce dernier et donc de la RT-PCR sur selles.

Notre deuxième étude portant sur des animaux en contact étroit montre qu'il y a certainement possibilité d'infection des chiens par des *Coronavirus* félins et de chats par des *Coronavirus* canins. Cette information mérite d'être vérifiée par des études ultérieures. Elle permettrait une avancée dans la compréhension de l'épidémiologie de la PIF.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ADDIE D.D. Interpretation of feline coronavirus serology. *Feline Pract.*, 1989, **2**, 232-235.
- (2) ADDIE D.D. and JARRET O. Feline coronavirus antibodies in cats. *Vet. Rec.*, 1992, **131(9)**, 202-203.
- (3) ADDIE D.D. and JARRET O. Use of a reverse-transcriptase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet. Rec.*, 2001, **148**, 649-653.
- (4) ADDIE D.D., SCHAAP I.A.T., NICOLSON L. and JARRET O. Persistence and transmission of natural type 1 feline coronavirus infection. *J. Gen. Virol.*, 2003, **84**, 2735-2744.
- (5) ADDIE D.D., PALTRNIERI S. and PEDERSEN N.C. Recommendation from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J. Fel. Med. Surg.*, 2004, **6**, 125-130.
- (6) BARLOUGH J.E. Cats, coronaviruses and coronavirus antibody tests. *J. small animal Pract.*, 1985, **26**, 353-362.
- (7) BARLOUGH J.E., STODDART C.A., SORRESSO G.P., JACBSON R.H. and SCOTT F.W. Experimental inoculation of cats with *canine coronavirus* and subsequent challenge with *feline infectious peritonitis virus*. *Lab. Anim. Sci.*, 1984, **34**, 592-597.
- (8) BENETKA V., KOLODZIEJEK J., WALK K., RENNHOFFER M. and MÖSTL K. M gene analysis of atypical strains of feline and canine coronavirus circulating in a Austrian animal shelter. *Vet. Rec.*, 2006, **159**, 170-175.
- (9) CACHON T. et CHUZEL T. Epidémiologie, pathogénie et symptômes de la PIF. *Le point vétérinaire*, 2005, **254**, 18-21.
- (10) CHUZEL T. et CACHON T. La PIF : diagnostic et traitement. *Le point vétérinaire*, 2005, **255**, 18-21.
- (11) DEWERCHIN H.L., CORNELISSEN E. and NAUWYNCK H.J. Replication of feline coronavirus in peripheal blood monocytes. *Arch. Virol.*, 2005, **1007**, 1-18.
- (12) ELOIT M. La péritonite infectieuse féline. *Recueil de médecine vétérinaire*, 1994, **170**, 701-709.
- (13) EVERMANN J., HENRY C. and MARKS S. Feline infectious peritonitis. *JAVMA*, 1995, **26**, 1130-1134.
- (14) FOLEY J.E., POLAND A., CARLSON J. and PEDERSON N. Risk factors for infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *JAVMA*, 1997, **210**, 1113-1118.
- (15) GONON V. Les coronavirus félins. *Virologie*, 1997, **2**, 205-213

- (16) GONON V. *Contribution à la caractérisation d'une réponse immune protectrice chez des chats infectés par un coronavirus félin*, DEA de microbiologie, Université Paris VII Denis Diderot, Paris, 1997.
- (17) GONON V., DUQUESNE V., KLONJKOWSKI B., MONTEIL M., AUBERT A. and ELOIT M. Clearance of infection in cats naturally infected with feline coronaviruses is associated with an anti-S glycoprotein antibody response. *J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 2315-2317.
- (18) HAGGMANS B.L., EGBERINK H.F. and HORZINEK M.C. Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *J. Virol.*, 1996, **70**, 8877-8883.
- (19) HAYASHI T., WAATABE Y., TAKENOUCHI T. and FUJIWARA K. Role of circulating antibodies after oral infection. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 1983, **45(4)**, 487-494.
- (20) HEENEY J.L., EVERMANN J.F., McKEIRAN A.J., MARKER-KRAUS L., ROELKE M.E., BUSH M., WILDT D.E., MELTZER D.G., COLLY L., LUKAS J., MANTON V.J., CARO T. and O'BRIEN S.J. Prevalence and implications of feline coronavirus infections of captive free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *J. Virol.*, 1990, **64**, 1965-1972
- (21) HERREWEGH A., DE GROOT R., CEPICA A., EGBERINK H., HORZINEK M. and ROTTIER P. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* , 1995, **33**, 684-689.
- (22) HERREWEGH A.,SMEENK I., HORZINEK M., ROTTIER P., and DE GROOT. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J. Virol.* , 1998, **72**, 4508-4514.
- (23) ISHIDA T., TORIYABE T, FUKUOKA Y. and MOTOYOSHI. Serodiagnostic of feline infectious peritonitis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1987, **218**, 577-578.
- (24) KENNEDY M.A., BRENNEMAN K., MILLSPAS R.K., BLACK J. and POTGIETER L.N.D. Correlation of genomic detection of feline coronavirus with various diagnostic assays for feline infectious peritonitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1981, **43(4)**, 666-670.
- (25) KUMMROW M., MELI M., HAESSIG M., GOENCZI E., POLAND A., PEDERSON N., HOFMANN-LEHMANN R and LUTZ H. Feline coronavirus serotype 1 et 2 : seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clin. Diag. Lab. Immun.*, 2005, **12**, 1209-1215.
- (26) LAU S., WOO P., LI K., HUANG YI, TSOI H., WONG B., WONG S., LEUNG S., CHAN K. and YUEN K. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in chinese horseshoe bat. *PNAS*, 2005, **102**, 14040-14045.
- (27) LE CORRE B., *Essai d'assainissement d'effectif félins infectés par un coronavirus*, Thèse pour le doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, 2000.
- (28) LE PODER S. Péritonite infectieuse féline. *Encyclopédie vétérinaire (Elsevier SAS, Paris)*, médecine générale, 2005, **1700**, 1-7

- (29) LE PODER S., FOURNIER A., REBEGA C., DUARTE L., PINHAS C. and ELOIT M. Identification of coronavirus in naturally infected cat that segregates between feline and canine coronavirus genotypes. *Septième congrès international de microbiologie vétérinaire*, Lisbonne, septembre 2006
- (30) LUTTGEN Neurologic aspects of feline infectious peritonitis disease. *Vet. Med. Reports.*, 1989, **1(2)**, 204-208.
- (31) LUTZ H., HAUSER B., and HORZINNEK M. La péritonite infectieuse féline, bilan des connaissances actuelles. *Rec. Med. Vet.*, 1986, **161**(1), 57-62.
- (32) Mc RENOLDS C and MACY D. Feline infectious peritonitis. Part I. Etiology and diagnostic. *The compendium*, 1997, **19(9)**, 1007-1015.
- (33) Mc RENOLDS C and MACY D. Feline infectious peritonitis. Part II. Treatment and prevention. *The compendium*, 1997, **19**
- (34) OLSEN C.W., CORAPI W.V., NGICHABE C.K., BAINES J.D. and SCOTT F.W. Monoclonal antibodies to spike protein of FIPV mediate ADE of infection of feline macrophage. *J. Virol.*, 1992, **66(3)**, 956-965.
- (35) POINDESSAULT SANTA CROCE A. *Prophylaxie des infections à Coronavirus félin*. Thèse pour le doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, 2005
- (36) PRATELLI A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Vet.Res.*, 2005, **37**, 191-200.
- (37) PRATELLI A., MARTELLA V., PESTELLO M., ELIA G., DEXARO N., BUONAVOGLIA D., CAMERO M., TEMPESTA M. and BUONAVOGLIA C. Identification in coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *J. Virol. Met.*, 2002, **107**, 213-222.
- (38) PEDERSEN N.C. Feline infectious peritonitis. *Ad. Vet. Sci.*, 1989, **33**, 421-426.
- (39) PEDERSEN N.C. Elimination of feline coronavirus infection from a large experimental specific pathogen free cat breeding colony by serologic testing and isolation. *Feline Pract.* 1995, **23(3)**, 96-103.
- (40) ROTTIER P. The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Vet. Microbiol.*, 1999, **69**, 117-125.
- (41) ROTTIER P., NAKAMURA K., SCHELLEN P., VOLDERS H. and HAIJEMA B.J. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of Feline Infectious is determined by mutation in feline coronavirus spike protein. *J. Virol.*, 2005, **79(22)**, 14122-14130.

- (42) SPARKES A., GRUFFYDD-JONES T.J. and HARBOUR D. An appraisal of the value of laboratory test in the diagnosis of the Feline Infectious Peritonitis. *J. Americ. Anim. Hospit. Assoc.*, 1994, **30**, 345-350.
- (43) STADLER K., MASIGNANI V., EICKMANN M., BECKER S., ABRIGNANI S., KLENK H.D. and RAPPUOLI R. SRAS – Beginning to understand a new virus. *Nat. Reviews Microbiol.*, 2003, **1**, 209-219.
- (44) TRESNAN D.B., Levis R. et Holmes K. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine and human coronaviruses of serogroup 1. *J. Virol.*, 1996, **70 (12)**, 8669-8674.
- (45) VENNEMA H., DE GROOT R., HARBOUR D.A., DALDERUP M. and GRUFFYDD-JONES T. Early death after infectious peritonitis virus challenge due to a recombinant vaccinia virus immunisation. *J. Virology*, 1990, **64(3)**, 1407-1409.
- (46) VENNEMA H., HEIJNEN L., ZIJDERVELD A. and HORZINEK M.C. Intracellular transport of recombinant coronavirus spike proteins implications for virus assembly. *J. Virol.* 1990, **64(1)**, 339-346.
- (47) VENNEMA H., POLAND A., HAWKINS K.F. and PEDERSEN N.C. A comparison of the genomes of FECVs and FIPVs, and what they tell us about the relationship between coronaviruses and their evolution. *Feline Pract.*, 1995, **23**, 40-44.
- (48) VENNEMA H., POLAND A., FOLEY J. and PEDERSEN N.C. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*, 1998, **243**, 150-157.
- (49) WEISS R.C. The diagnosis and clinical management of feline infectious peritonitis. *Vet. Med.*, 1991, **86**, 726-733.