

Année 2002

Apport de la méthode PCR au diagnostic des lésions
cornéennes d'origine herpétique chez le chat

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le

par

Alexandra GROUX

Né (e) le 31 octobre 1977 à Remiremont (Vosges)

JURY

Président :

Membres

Directeur : M. Clerc

Professeur

Assesseur : M. Bellier

Maître de conférences

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MORAILLON Robert

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs PARODI André-Laurent, PILET Charles

Professeurs honoraires : MM. BORDET Roger, BUSSIERAS Jean, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, THERET Marcel, VUILLAUME Robert

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

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

-U.P. D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur* M. DEGUEURCE Christophe, Maître de conférences Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, AERC -U.P. DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur Mme VIALE Anne-Claire, Maître de conférences -U.P. DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur * Mme COMBRISSE Hélène, Professeur M. TIRET Laurent, Maître de conférences -U.P. DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * Mme HUYNH-DELERME, Maître de conférences contractuel M. TISSIER Renaud, Maître de conférences contractuel	-U.P. D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur * M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur Mlle BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences -U.P. DE BIOCHIMIE M. BELLIER, Maître de conférences* M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences -U.P. DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * (rattaché au DEPEC) Mme ALCON Sophie, Maître de conférences contractuel -DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur (rattaché au DPASP) -DISCIPLINE : BIOLOGIE MOLECULAIRE Mlle ABITBOL Marie, Maître de conférences contractuel
--	--

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

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjointe : Mme BEGON Dominique , Professeur

-U.P. DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* M. CLERC Bernard, Professeur Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences contractuel Melle MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel - U.P. DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur * M. TNIBAR Mohamed, Maître de conférences contractuel M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences Mme DESJARDINS-PESSON Isabelle, Maître de confér..contractuel Melle GIRAUDET Aude, Maître de conférences contractuel- - U.P. DE REPRODUCTION ANIMALE M. MIALOT Jean-Paul, Professeur * (rattaché au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)	-U.P. DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur M. VIGUIER Eric, Maître de conférences Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle RAVARY Bérangère, AERC M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de Conférences contractuel -UNITE FONCTIONNELLE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur M. RUEL Yannick, AERC -U.P. DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Maître de conférences Melle MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel -U.P. D'ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Maître de conférences
--	---

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

Chef du département : M. CERF Olivier, Professeur - Adjoint : Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Maître de conférences

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

Ingénieurs Professeurs agrégés certifiés (IPAC) :
Mme CONAN Muriel, Professeur d'Anglais
Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité Pédagogique
U.P. : Unité Pédagogique
AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

A Monsieur le Professeur

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux

A Monsieur le Professeur Bernard Clerc

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Ophthalmologie

Qui nous a fait l'honneur de nous proposer ce travail et de nous guider dans son accomplissement ,

Qu'il trouve ici l'expression de notre plus vive gratitude

A Monsieur Sylvain Bellier

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Biochimie

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse

Sincères remerciements

A Madame Corinne Boucraut-Baralon

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Laboratoire Scanelis

Qui m'a offert de précieux renseignements

Remerciements chaleureux

A mes parents et à ma sœur,
Pour leur soutien et leur amour

A David, mon mari,
Pour son aide précieuse à mes côtés,
Pour notre amour et notre complicité

A Aurélien, mon fils,
Parce qu'il est un bébé très sage
Et qu'il m'a ainsi permis de travailler ma thèse
Tout en nous ménageant des pauses fou- rires

A tous mes amis
Parce qu'ils me sont infiniment précieux

Apport de la méthode PCR au diagnostic des lésions cornéennes d'origine herpétique chez le chat.

NOM et Prénom : Groux Alexandra

Résumé

L'Herpès virus est une maladie très répandue dans la population féline. Dans sa forme chronique, les épisodes de récurrence peuvent se manifester par des symptômes oculaires uniquement. Il est donc intéressant, face à une atteinte oculaire de type conjonctivite ou kératite, de rechercher l'Herpès virus de type 1. Les différents examens complémentaires disponibles sont, outre les colorants, la cytologie sur frottis cornéen, l'immunofluorescence, l'isolement viral et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La PCR, dernière née de ces techniques, apparaît comme la plus sensible. Notre étude, portant sur trente-cinq chats présentant une symptomatologie compatible avec une herpès virus oculaire, nous a permis de démontrer que cette technique est également spécifique, puisque seuls douze des chats testés sont positifs. L'analyse d'études comparatives réalisées aux Etats-Unis nous a permis de confirmer que, de tous les examens complémentaires disponibles, la PCR est bien le plus fiable. En outre, la PCR quantitative avec sonde TaqMan offre la perspective d'un suivi de la charge virale au cours du traitement.

Mots clés

Herpès virus félin, PCR, examen complémentaire, kératite, conjonctivite, sensibilité, spécificité.

Jury :

Président : Pr. Delchier

Directeur : Pr. B. Clerc

Assesseur : Dr. Bellier

Adresse de l'auteur :

Mme Troyano- Groux Alexandra
2, rue d'Estienne d'Orves
94700 Maisons- Alfort

Interest of PCR in the diagnosis of herpetic corneal lesions in cats.

SURNAME : GROUX

Given name : Alexandra

Summary

Feline rhinotracheitis is a widespread disease within the feline population. Feline Herpes virus 1 (FHV-1) keratitis of adult cats contrasts with the acute respiratory syndrome by its tendency to be chronic and recurrent in nature. Therefore, it is interesting for the clinician to make a laboratory diagnosis of FHV-1, when confronted with conjunctivitis or keratitis. Laboratory diagnosis, apart from staining, includes conjunctival cytology, immunofluorescent antibody staining, virus isolation and polymerase chain reaction. PCR, the newest of these tests, is the most sensitive. Our study, made on thirty- five cats with an ocular symptomatology compatible with FHV-1 infection, allows us to say that this test also has a good specificity, while only twelve cats were PCR positive. The analysis of comparative studies made in the United States of America permits us to confirm that, of all tests available, PCR is the most reliable. In addition, real- time Taq Man PCR allows the clinician to follow virus titer up with the treatment.

Keywords

Feline Herpes virus type 1, PCR, Laboratory tests, keratitis, conjunctivitis, sensibility, specificity

Jury :

Président : Pr. Delchier

Director : Pr. B. Clerc

Assesor : Dr. Bellier

Guest : M.

Author's address:

Mrs Troyano- Groux Alexandra
2, rue d'Estienne d'Orves
94700 Maisons- Alfort

Table des matières

<u>Introduction</u>	p3
<u>Première partie : l'herpès virose, étude bibliographique. Etude détaillée du diagnostique</u>	p4
1.1 Définitions- Généralités	
1.1.1 <i>Définition des lésions cornéennes les plus fréquentes chez le chat</i>	p7
1.1.1.1 Kératites.....	p7
1.1.1.2 Ulcère cornéen- kératites ulcéraives.....	p8
1.1.2 <i>Spécificité des kératites félines</i>	p8
1.2 Kératite herpétique à HVF-1	p9
1.1.3 <i>Présentation du virus</i>	p9
1.1.3.1 Etiologie.....	p8
1.1.3.2 Pathogénie.....	p10
1.1.3.3 Epidémiologie.....	p 12
1.1.4 <i>Symptômes oculaires de l'herpès virose féline</i>	p 15
1.1.4.1 Chaton nouveau-né.....	p15
1.1.4.2 Chats de un à six mois.....	p16
1.1.4.3 Chats adultes.....	p17
1.1.5 <i>Diagnostic différentiel</i>	p20
1.1.5.1 Chlamydioses.....	p20
1.1.5.2 Calicivirose.....	p21
1.1.5.3 Association à d'autres viroses.....	p21
1.1.5.4 Mycoplasmoses.....	p21
1.1.6 <i>Intérêt des examens complémentaires chez les animaux de plus de six mois</i>	p22
1.1.6.1 Intérêt des colorants : fluorescéine et rose Bengale.....	p22
1.1.6.2 Cytologie sur frottis cornéen.....	p23
1.1.6.3 Immunofluorescence.....	p25
1.1.6.4 Isolement viral.....	p25
1.1.6.5 Réaction de polymérisation en chaîne : PCR.....	p25
1.2.4.5.1 Traitement de l'échantillon prélevé.....	p26
1.2.4.5.2 Technique de polymérisation in vitro.....	p27
<u>Deuxième partie : étude du diagnostic de l'herpès virose par la méthode PCR....</u>	p30
2.1 Méthode- Mode opératoire	p30
2.1.1 <i>Animaux</i>	p30
2.1.2 <i>Matériel</i>	p30
2.1.3 <i>Méthode</i>	p31
2.1.3.1 Traitement du prélèvement.....	p31
2.1.3.2 Polymerase chain reaction ou polymérisation in vitro.....	p31
2.1.3.2.1 La PCR nichée.....	p32
2.1.3.2.2 La PCR en temps réel avec sonde Taq Man.....	p34
2.2 Résultats	p36
2.2.1 <i>Résultats</i>	p36
2.2.2 <i>Limites</i>	p 37
2.3 Discussion	p40

2.3.1 <i>Discussion des résultats liés au sexe de l'animal</i>	p40
2.3.2 <i>Comparaison avec les méthodes de diagnostic employées précédemment</i>	p40
2.3.2.1 Différence de sensibilité entre la culture virale et la PCR pour la détection de l'HVF-1 chez des chats vaccinés ou non.....	p41
2.3.2.2. Comparaison de la PCR, de l'isolement viral et de l'immunofluorescence indirecte pour la détection d'herpès viroses spontanées.....	p41
2.3.2.3 Diagnostic de l'infection par l'herpès virus félin par immunohistochimie, PCR et hybridation in situ.....	p43
<u>Conclusion</u>	p45
Bibliographie	p46
Annexes	p49

Introduction

Le coryza du chat est un terme générique recouvrant une grande quantité de symptômes, respiratoires et oculaires. On distingue habituellement le coryza contagieux du chat et le coryza chronique, qui est souvent la conséquence directe d'un coryza contagieux mais qui peut également évoluer sous forme récidivante (17). Trois agents infectieux sont impliqués dans ce syndrome ; l'herpès virus félin de type 1, le calicivirus et des chlamydies. Des études épidémiologiques montrent que 50 à 70 % des chats ont eu un contact avec l'herpès virus félin de type 1 (HVF1). (18)

Les symptômes du coryza chronique à herpès virus peuvent être frustes et se limiter à une atteinte d'un ou des deux yeux. Les propriétaires des animaux qui ont contracté la maladie avant leur achat ne sont pas toujours mis au courant de l'atteinte de leur animal et de la possibilité de récurrence (la vaccination ne protège pas des récurrences). Il convient donc pour le praticien de ne pas écarter une origine herpétique (portage chronique) en présence d'une atteinte de la cornée. Il est alors intéressant de mettre en évidence le virus lui-même, ce que permet la technique de polymérisation en chaîne.

Cette technique appliquée à l'herpès virus félin est d'emploi assez récent en France et les premiers prélèvements de l'ENVA datent de décembre 2000.

L'étude porte sur trente cinq chats présentés à la consultation d'ophtalmologie de l'école vétérinaire d'Alfort entre décembre 2000 et août 2002, présentant une symptomatologie compatible avec une herpès virose oculaire. Cette étude doit permettre d'évaluer la proportion de cas où la suspicion clinique est confirmée par les examens de laboratoire.

Les objectifs de cette étude seront donc :

- de démontrer l'intérêt de la technique de polymérisation en chaîne dans le diagnostic de lésions cornéennes d'origine herpétique lorsque l'examen clinique avait conduit à suspecter une herpès virose ;
- de démontrer la supériorité des techniques de polymérisation en chaîne sur les autres examens complémentaires disponibles antérieurement (cytologie, immunofluorescence).

Après avoir rappelé de manière succincte les symptômes oculaires de l'herpès virose féline, nous nous attacherons dans un premier temps à montrer l'intérêt des examens complémentaires lors de kératite eosinophilique et/ou d'ulcères cornéens mais également à comparer les différents examens entre eux à partir des données disponibles dans divers ouvrages vétérinaires. Dans un second temps, nous examinerons les résultats obtenus sur les prélèvements réalisés à l'ENVA et nous les comparerons aux données de la littérature.

1. L'herpès virose, étude bibliographique. Etude détaillée du diagnostic.

1.1 Définitions - Généralités

L'œil est un organe globuleux, pair, céphalique, qui intervient dans le phénomène de la vision, en association avec le nerf optique et le cortex cérébral occipital. Le globe oculaire est presque sphérique chez les carnivores. Il est formé de trois tuniques concentriques : la tunique fibreuse, externe, la tunique vasculaire, externe, et la tunique nerveuse, la plus interne.

La tunique fibreuse, la plus épaisse des trois, est formée d'une partie opaque, la sclère et d'une partie transparente, la cornée, au pôle antérieur du globe. Ces deux zones se rejoignent au niveau du limbe.

La cornée, segment antérieur transparent de la tunique fibreuse, constitue environ un quart de la tunique fibreuse (20). Elle est circulaire, avec des faces lisses et brillantes, et laisse entrevoir par transparence l'iris et la pupille. Son rayon de courbure est en moyenne de 8 mm, sa valeur angulaire de 115 à 120°. Son diamètre varie de 12.5 à 15.5 mm. Sa structure est complexe et comporte cinq couches.

De l'extérieur vers l'intérieur on trouve :

- un épithélium antérieur en continuité à la périphérie avec celui de la conjonctive ; cet épithélium forme de nombreuses villosités, capte le mucus du film lacrymal et régule l'hydratation du stroma. Des lésions de cet épithélium sont à l'origine d'œdème cornéen.

- une lame limitante antérieure ou membrane de Bowman, très réduite chez les carnivores.

- un tissu propre, encore appelé substance propre ou stroma, constitué de fibres de collagène séparées par des kératocytes. Ces fibres, parallèles entre elles dans une même couche, s'affrontent les unes aux autres à angle oblique avec les couches voisines, s'organisant en lamelles superposées qui peuvent glisser les unes sur les autres. Elles sont

noyées dans une substance fondamentale ayant le même indice de réfraction qu'elles, la transparence de la cornée étant maintenue par imbibition liquidienne ; cette imbibition résulte de la tension osmotique qui s'établit entre le film lacrymal et l'humeur aqueuse qui tend à extraire l'eau de la cornée. Cette régulation est complétée par le travail des cellules endothéliales. Toute lésion de la cornée, toute perturbation de ses composants ou de l'arrangement régulier des lamelles, par hypertension par exemple, entraîne donc une opacité. Ainsi à la jonction cornéo-sclérale (le limbe), l'arrangement des fibres de collagène se désorganise progressivement : la sclère devient totalement opaque.

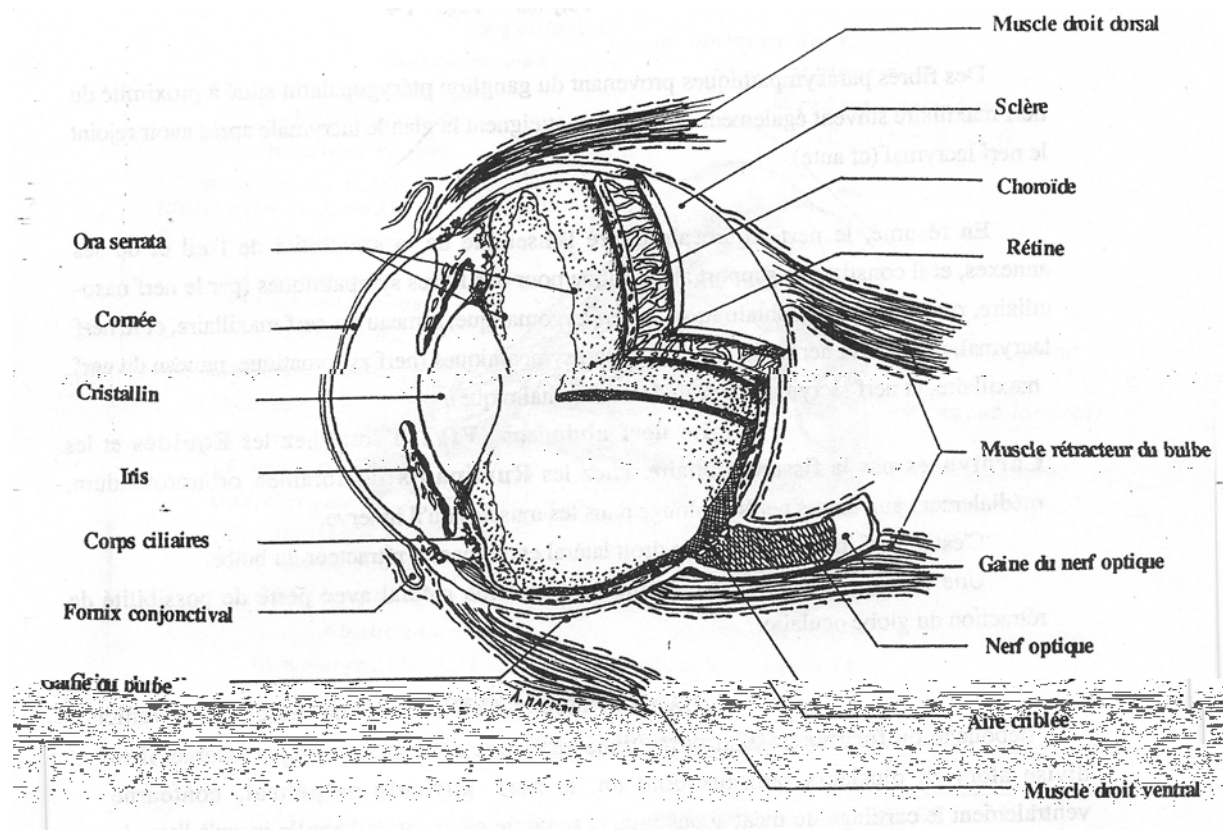
- une lame limitante postérieure (membrane de Descemet) en continuité avec l'épithélium antérieur de l'iris et qui constitue le ligament pectiné. Ce ligament laisse des espaces appelés espaces irido-cornéens, qui occupent le fond de l'angle de même nom. L'humeur aqueuse est drainée à travers le réseau trabéculaire que constitue le ligament pectiné jusqu'au plexus veineux scléral.
- un épithélium postérieur formé de cellules aplaties, règle l'hydratation du stroma de façon active et encore plus importante que l'épithélium antérieur.

La cornée, normalement avasculaire, est nourrie par les capillaires du limbe, le film lacrymal et l'humeur aqueuse. (8)

C'est une formation très sensible, innervée par les branches des nerfs ciliaires longs, rameaux du nerf ophtalmique (lui-même branche du trijumeau), d'où la grande fréquence du blépharospasme en cas d'atteinte cornéenne.

Figure 1 : ŒIL DE CHIEN OUVERT POUR MONTRER LES TROIS TUNIQUES

D'après Sauret (20) p 30



1.1.1 Définition des lésions cornéennes les plus courantes chez le chat

1.1.1.1 Kératites

Ce sont des affections inflammatoires acquises de la cornée dont le classement s'effectue soit en fonction de leur évolution (aiguë ou chronique), de leur étiologie ou de leur profondeur : kératite affectant la totalité de la cornée, kératite superficielle affectant l'épithélium cornéen, kératite stromale ou interstitielle affectant le stroma cornéen, kératite endothéliale affectant l'endothélium.

1.1.1.2 Ulcère cornéen – Kératites ulcératives

« Par définition, on distingue les érosions cornéennes et les abrasions qui détruisent l'épithélium cornéen mais laissent intacte la membrane basale des ulcères, qui sont caractérisés par une perte de l'épithélium et d'une certaine quantité de stroma.

Les pertes de substance superficielle, où l'inflammation cornéenne domine, sont appelées kératites ulcératives simples. L'ulcère cornéen est une perte de substance plus profonde du stroma. Quand l'ulcère s'étend jusqu'à la membrane de Descemet, cette dernière, poussée par l'humeur aqueuse, fait hernie ; on parle de Descemetocèle. Au delà, la cornée est perforée. »

(8)

Dans l'espèce féline on rencontre, de façon courante, des kératites avec ou sans ulcération cornéenne : les kératites ulcératives semblent toutefois plus fréquentes.

1.1.2 Spécificité des kératites félines

- Si l'on rencontre de façon courante en ophtalmologie féline des kératites avec ou sans ulcération, les kératites ulcératives semblent être les plus courantes. (6)
- La distinction entre la vascularisation cornéenne superficielle, d'origine conjonctivale, présente lors de kératite chronique et la vascularisation cornéenne profonde, d'origine ciliaire, présente lors de kératite interstitielle ou de kérato-uvéite, est plus difficile à faire chez le chat que chez le chien (2). Dans l'espèce féline en effet, les néo-vaisseaux cornéens périphériques ne sont visibles qu'à leur entrée dans le stroma, et leur situation en profondeur fait appel au diagnostic biomicroscopique.
- Les kérato-conjonctivites aiguës s'accompagnent chez le chat d'un chémosis souvent marqué, lié à la plasticité conjonctivale et à la médiocre organisation du chorion conjonctif dans cette espèce. (6)

- Contrairement au chien, où la pigmentation cornéenne est fréquente lors de kératite chronique, elle est exceptionnelle chez le chat, à l'exception des conséquences d'affections néo-natales telles l'herpès virose. (2)
- Les séquelles de cicatrisation stromale profonde ou difficile, ou d'ulcères superficiels d'évolution lente, sont beaucoup moins marquées chez le chat que chez le chien (2). En effet, l'arrangement des faisceaux de collagène se fait précocement et régulièrement et les dépôts de lipides ou de sels calciques stromaux superficiels sont rares.
- Les kératites à éosinophiles et le séquestre cornéen sont des affections inflammatoires de la cornée n'ayant pas d'équivalent chez le chien. (6)

1.2 Kératite herpétique à HVF 1

Les différents agents étiologiques de la rhinotrachéite infectieuse ou coryza félin sont l'herpès virus félin de type 1, les calicivirus et les chlamydies (*C. felis* et *C. psittaci*). Dans cette étude, nous nous limiterons à l'herpès virus félin de type 1 (HVF1). Le HVF-1 est la seule cause virale connue de kératite chez le chat. (10)

Il faut savoir que dans les cas de chlamydiose, on voit souvent un écoulement purulent mais jamais d'ulcère.

1.2.1 Présentation du virus

1.2.1.1 Etiologie

❖ Propriétés physiques, chimiques et antigéniques

L'herpès virus félin de type 1 appartient à la sous-famille des Alphaherpesvirinae. C'est à cette même famille qu'appartient l'herpès virus simplex de l'homme.

Ce sont des virus à ADN. Leur structure est la suivante : un double brin d'ADN entouré d'une capsule icosaédrique, elle-même enveloppée par une membrane lipidique comportant de nombreuses glycoprotéines.

Il existe de façon concomitante des particules enveloppées mesurant 180 nm de diamètre et des particules non enveloppées de 108 nm de diamètre.

Partout dans le monde, on observe une grande homogénéité de souche infectieuse, même si des différences de manifestations cliniques ont pu être observées en fonction des isolats. (12)

❖ Sensibilité aux agents physiques et biologiques (12)

- Le virus est sensible aux agents de nettoyage employés couramment. L'infectivité est réduite ou éliminée par l'éther déoxycholate de chloroforme et l'hypochlorite de sodium (eau de javel).
- Dans une culture cellulaire, le virus perd 90 % de sa viabilité en six heures à 37°C, en six jours à 25°C, et en un mois à 4°C.
- La stabilité maximale du virus est obtenue à pH 6. L'inactivation virale est complète en trois heures pour un pH de 3 ou pour un pH de 9.
- La persistance du virus est faible dans l'environnement. Dans un environnement humide, on peut retrouver du virus pendant 18 heures, alors que ce laps de temps est réduit à moins de 12 heures dans une pièce dont l'atmosphère est sèche.

1.2.1.2. Pathogénie

L'herpès virus félin présente une très grande spécificité d'hôte : il infecte seulement les chats et on ne peut le cultiver que sur des cellules de chats. (18)

Deux phases sont classiquement décrites dans l'action du virus : la phase de lyse et la phase de latence.

- Phase de lyse

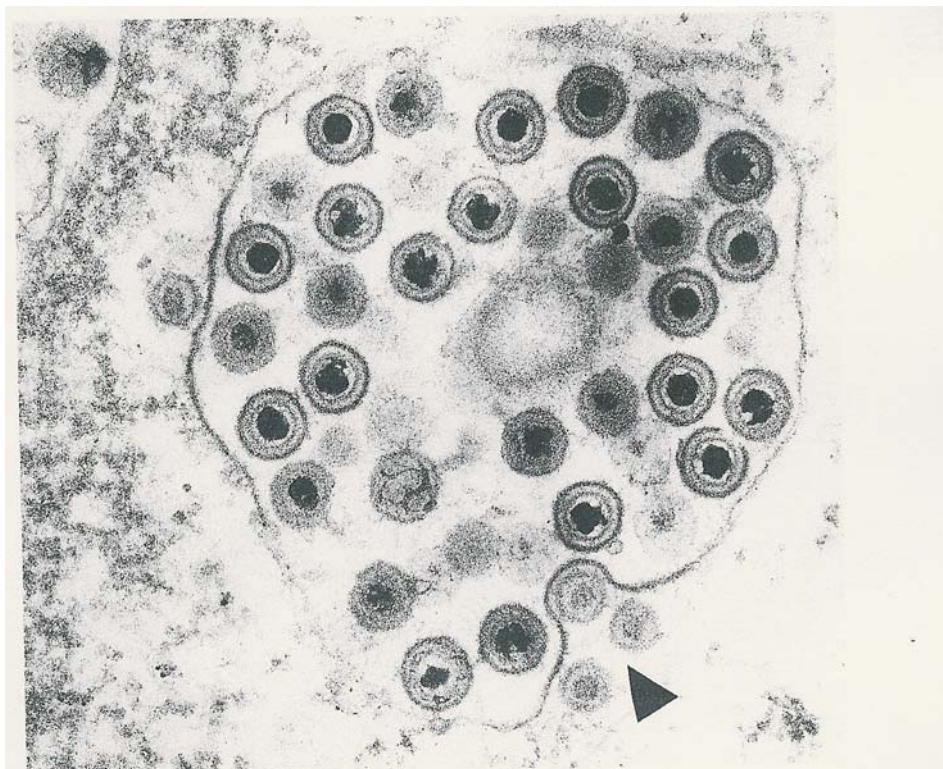
La membrane lipidique entourant la particule virale fusionne avec la membrane cellulaire, libérant son contenu dans le cytoplasme. L'ADN viral pénètre ensuite dans le noyau cellulaire et toutes les synthèses cellulaires sont alors détournées au profit de la réplication virale.

Cette réplication virale a un effet cytopathique direct qui entraîne la lyse de la cellule infectée. La réplication est très rapide dans l'épithélium des voies respiratoires supérieures ainsi que dans l'épithélium conjonctival.

Figure n° 2 : cellule infectée par un herpèsvirus.

Photographie d'une coupe fine vue au microscope électronique (x 65 000)

D'après Murphy et al., (18)



- Phase de latence

C'est une phase de quiescence virale, pendant laquelle aucun signe clinique ne peut être observé ni aucun signe histologique d'inflammation détecté.

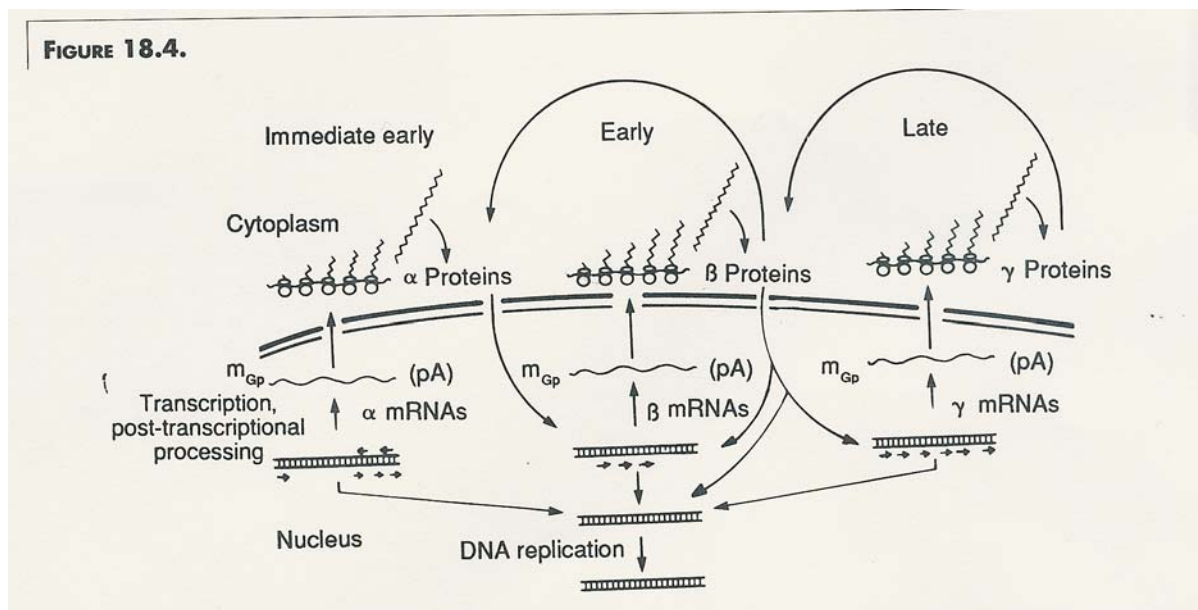
Une des caractéristiques des alphaherpès virus est leur tendance à établir une latence dans les ganglions sensitifs. Ils persistent à l'état latent dans le ganglion de Gasser (trijumeau). Il n'est pas exclu que des sites de latence non neuronaux soient d'égale importance. (10)

Tout stress est susceptible de provoquer un réveil de l'infection. De même, l'utilisation de glucocorticoïdes est susceptible de les réactiver. (9 ;15).

La réactivation périodique s'explique par un transport antérograde du virus via l'axone.

Figure 3 : Cycle de réplication du HVF- 1

D'après Murphy et al., (18)



1.2.1.3 Epidémiologie

- Epidémiologie descriptive

L'herpès virus félin est un virus dont la répartition est ubiquiste.

Il affecte des chats de tous âges, avec un âge moyen de 2.9 ± 2.7 ans et la palette des âges des animaux infectés s'étale de 1 mois à 11 ans. (10)

L'infection concomitante par le virus leucémogène félin (FeLV) ou par le virus de l'immunodéficience féline (FIV) conduit à des formes cliniques plus graves, du fait de l'immunodéficience liée à ces deux virus (10). De même, les animaux très jeunes présentent des formes très graves.

Depuis la généralisation de la vaccination (vaccins vivants atténués ou inactivés) dans les années 1970, les formes cliniques graves ont diminué. (25)

- **Epidémiologie analytique**

La transmission du virus se produit au cours d'un contact rapproché entre le chat porteur et un autre chat. Elle peut également avoir lieu via les sécrétions corporelles, en particulier les sécrétions respiratoires.

Les chats infectés de manière aiguë sont plus à même de transmettre le virus en raison de la grande quantité de particules virales présentes dans leurs sécrétions. Cependant, il ne faut pas oublier que les porteurs latents représentent des sources insidieuses de contamination virale, puisque la ré-excrétion ne s'accompagne pas nécessairement de signes cliniques et qu'elle peut être provoquée par de nombreux facteurs de stress.

Les éternuements projettent les particules virales dans un champ d'environ un mètre cinquante autour du chat, exposant ainsi à la contamination les chats se trouvant à proximité. La surpopulation féline existant au sein de chatteries ou de refuges augmente considérablement la probabilité de la transmission de l'infection. (21)

Nous avons vu précédemment que la persistance du virus dans l'environnement était faible, mais qu'elle était augmentée en milieu humide. Ainsi, les mains humides sont un véhicule idéal pour le virus et conduisent la personne manipulatrice à contaminer des chats. (21)

Les cages mal nettoyées du vétérinaire ou de l'éleveur sont également une cause fréquente de contamination. (21)

Figure 4 : cycle de transmission de l'herpès virus félin (FRV) et du calicivirus (FCV).
D'après Stiles (21)

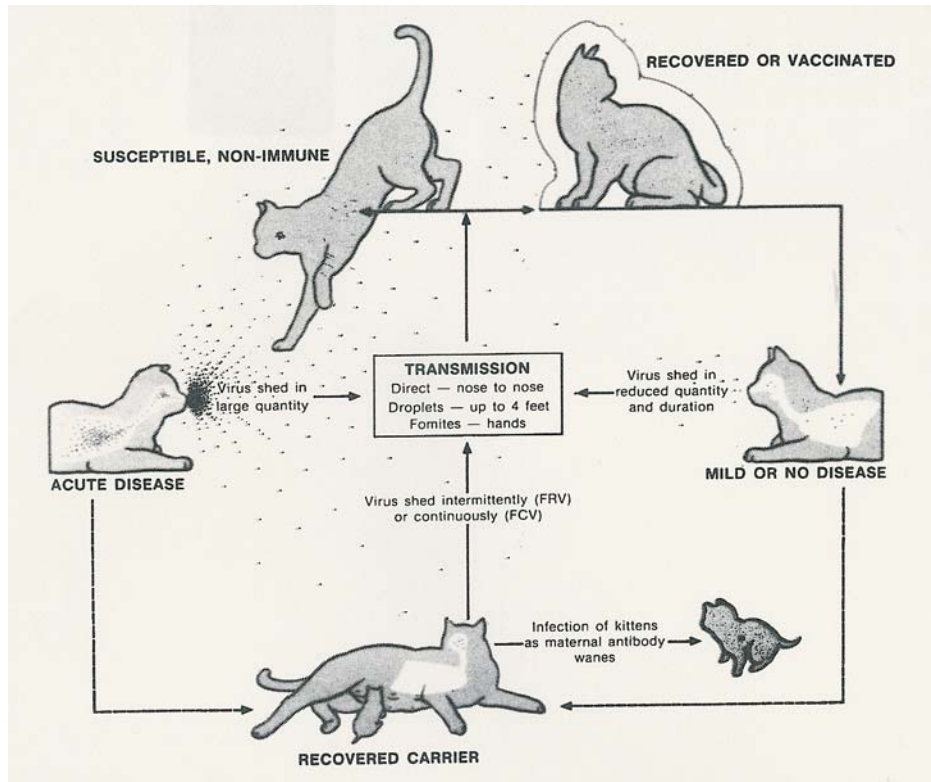
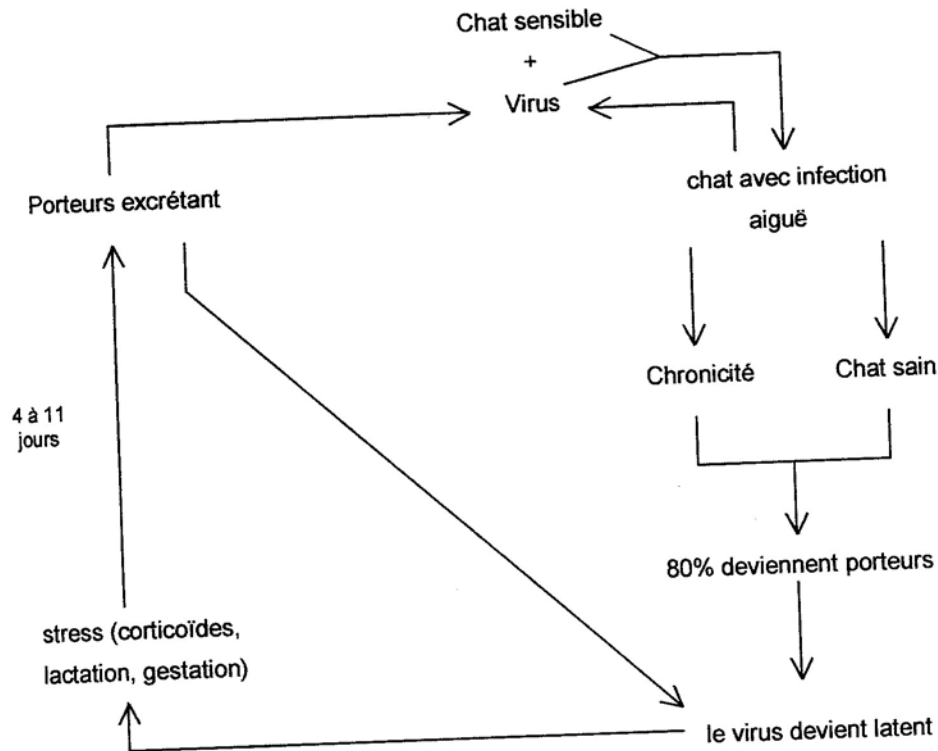


Figure 5 : état de porteur dans le HVF-1

D'après Stiles, (21)



1.2.2 Symptômes oculaires de l'herpès virose féline

Lors d'atteinte par l'HFV1, la conjonctive et la cornée peuvent être concernées en dehors de tous signes respiratoires. De même, les symptômes observés varient en fonction de l'âge de l'animal atteint.

1.2.2.1 Chaton nouveau-né

Les signes respiratoires, les symptômes physiques (larmolement rapidement muco-purulent avec surinfection bactérienne cornéenne possible) et fonctionnels (douleur avec blépharospasme) sont très marqués.

Durant le premier mois de la vie, une kérato-conjonctivite sèche souvent transitoire peut être observée. (6)

Le virus entraîne une inflammation conjonctivale et une surinfection bactérienne avant même l'ouverture des paupières (« ophtalmie néo-natale »). (8)

Il faut noter que l'infection néo-natale avant l'ouverture des paupières (10-15 jours) peut être responsable de perforations cornéennes.

Des séquelles importantes sont à prévoir :

- adhérences réactionnelles ou symblépharons liés aux importants remaniements épithéliaux ainsi qu'au fort potentiel de cicatrisation de la conjonctive et au blépharospasme ;
- occlusion des voies lacrymales par l'inflammation ;
- entropion. La formation d'un entropion est consécutive au blépharospasme très intense causée par l'infection par l'HVF-1. L'entropion étant une affection peu fréquente chez le chat, il convient de suspecter une atteinte par l'herpès virus lorsque cette affection est observée. (5)

1.2.2.2 Chats de un à six mois

- Signes généraux

Chez les chats domestiques, la primo-infection se caractérise par une réplication diffuse du virus dans l'épithélium des organes du haut appareil respiratoire (sinus, muqueuse nasale, amygdales). Les signes cliniques résultent d'un effet cytopathique direct sur les cellules des tissus infectés et peuvent être aggravés par une surinfection bactérienne. Les signes cliniques typiques d'une infection par le HFV-1 sont des éternuements, un écoulement nasal muco-purulent. Les symptômes persistent en général pendant dix à quatorze jours. Il faut cependant noter que l'importance et la durée des signes cliniques varient avec l'importance de l'inoculum.

- Signes ophtalmologiques

On observe une conjonctivite aiguë après une incubation de deux à trois jours.

La grande majorité des chats guérit cliniquement mais 80 % demeurent des porteurs latents (8) (14) et chez 45 % de ces chats, le virus latent se réactivera spontanément entraînant soit un nouvel accès clinique soit une simple réactivation sans symptômes. (10)

1.2.2.3 Chats adultes

- Conjonctivite herpétique (10)

Le FHV1 peut être à l'origine de conjonctivites chez les chats qui ont été exposés et ont guéri de l'infection plus tôt au cours de leur vie.

Les récurrences sont souvent liées à un stress : atteinte par une autre maladie, introduction d'un nouvel animal dans le foyer, déménagement...

Chez ces chats, les signes d'infection respiratoire sont souvent absents. Comme au cours du syndrome respiratoire aigu, la conjonctivite tend à être bilatérale.

L'infection conjointe par le virus de l'immunodéficience féline (FIV) ou par le virus leucémogène félin (FeLV) conduit à une récurrence plus rapprochée des épisodes de conjonctivite.

Les signes cliniques de la conjonctivite à FHV1 chez le chat adulte ne sont pas diagnostiques : la conjonctive est hyperhémiee, il y a un blépharospasme intermittent, et les sécrétions oculaires sont séreuses. Lorsque l'atteinte progresse, les sécrétions deviennent muqueuses à muco-purulentes et la conjonctive enfle. Le chemosis n'est pourtant pas un signe rencontré obligatoirement lors de conjonctivite herpétique.

- Kératite herpétique (10)

Le FHV-1 semble causer des dégâts cornéens via deux mécanismes différents.

D'une part, il peut causer une ulcération cornéenne par ses effets cytopathiques sur l'épithélium cornéen et, lorsque cela se produit, des lésions caractéristiques en carte de

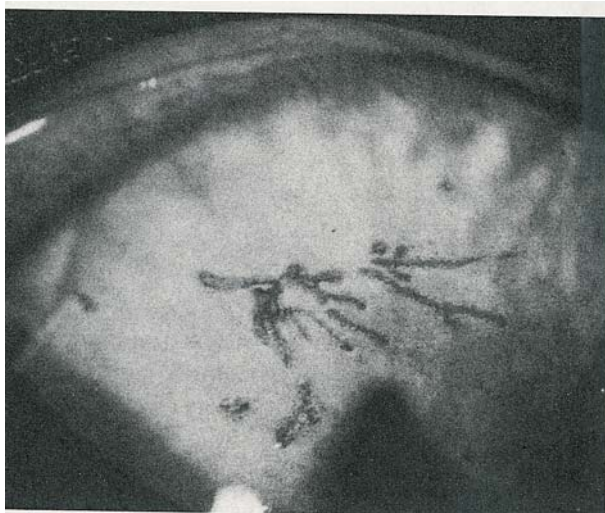
géographie (ou dendritique) sont observées. Cependant, le tropisme du virus pour les tissus cornéens est limité. (15) Pour cette raison, la kératite dendritique peut être difficilement observable.

D'autre part, puisque les lésions épithéliales n'atteignent que rarement la profondeur de la membrane de Bowman, leur identification peut s'avérer difficile sans l'emploi de rose Bengale.

Au cours de la primo-infection oculaire, les ulcères cornéens tendent à être petits et nombreux. Ils sont dits microdendritiques.

Figure 6 : Ulcère cornéen coloré au rose Bengale

D'après Nasisse et al., (15)



Le second mécanisme à l'origine de dommages cornéens n'est pas lié directement à la réplication virale. En effet, l'apparition de dommages sur le stroma cornéen est précédée par l'absence prolongée de l'épithélium cornéen, une diminution du nombre de lymphocytes circulants et du nombre de mitoses, ainsi que l'acquisition des antigènes viraux par le stroma cornéen. (16) Ainsi, dans la kératite stromale liée au HVF-1, la suppression de la réponse immunitaire locale semble permettre au virus d'accéder au stroma cornéen.

L'emploi de topiques ou d'injections sous-conjonctivales à base de corticostéroïdes tend à favoriser l'apparition de la kératite stromale. (21)

Les signes cliniques de la kératite herpétique varient en fonction de la chronicité et de la profondeur de l'infection :

- la kératite dendritique aiguë s'accompagne d'une conjonctivite modérée, d'un blépharospasme et souvent d'un écoulement oculaire séreux à muco-purulent. (10)
- lors de kératite chronique , le stroma cornéen peut être légèrement oedématié dans l'aire de la lésion et des aires de fibrose et de néovascularisation superficielle peuvent apparaître.

Les formes épithéliales et stromales de kératite herpétiques peuvent être unilatérales (10).

La formation d'un séquestre cornéen intervient parfois secondairement à l'ulcération chronique liée au HVF-1. Les chats présentant des ulcères cornéens ne se comblant pas pendant plusieurs semaines, présentent un haut risque de formation d'un séquestre cornéen au sein du stroma ainsi exposé. De plus, les chats recevant des corticostéroïdes sous forme de topiques ou via des injections sous-conjonctivales ont plus de risques de développer un séquestre cornéen. (21)

Un entropion se développe parfois secondairement à la douleur oculaire associée aux ulcères cornéens ou à la conjonctivite. Cet entropion aggrave la douleur oculaire et peut également favoriser la survenue d'un séquestre cornéen. (21)

L'infection par le HVF-1 est peu fréquemment associée à une insuffisance de sécrétion lacrymale, et à une diminution de la sensibilité cornéenne. (10)

Récemment, il a été suggéré que l'HVF-1 pourrait être une cause d'uvéite antérieure chez le chat. (13)

Au niveau histopathologique, une nécrose épithéliale complète intervient dans les huit jours qui suivent l'exposition à un inoculum important de virus. Cette nécrose s'accompagne d'un infiltrat intense de polynucléaires polymorphes.

La persistance de l'atteinte oculaire sans signes respiratoires s'explique par l'incapacité du HVF1 à stimuler l'immunité locale.

1.2.3 Diagnostic différentiel

1.2.3.1 Chlamydioses (à chlamydia psittaci)

Chlamydia psittaci est un pathogène commun chez le chat. Il infecte primitivement la conjonctive. L'infection respiratoire se produit mais elle n'est que rarement exprimée cliniquement.

Notons que *Chlamydia psittaci* est un agent de zoonose, et même si son potentiel zoonotique n'est que peu élevé, on recense de nombreux cas de suspicion de transmission humaine à partir d'un chat.

Le signe clinique typique chez le chat est une conjonctivite unilatérale avec atteinte secondaire de l'autre œil. Cette infection touche des chats de tous âges. Au cours de l'infection aiguë, le signe clinique caractéristique est l'apparition d'une hyperhémie conjonctivale, d'un chémosis et d'un écoulement oculaire séreux pouvant devenir purulent.

Cependant, même si certains signes sont dits caractéristiques, le diagnostic de la conjonctivite à chlamydies chez le chat ne peut être fait uniquement sur la base des observations cliniques. (19)

Un test immédiat réalisable en clinique est la recherche des inclusions cytologiques de chlamydies au sein du cytoplasme de cellules épithéliales colorées à l'aide de la coloration de Giemsa, de Wright-Giemsa ou de Papanicolaou modifiée. (19). Si les inclusions sont visualisées, le résultat est positif. Dans le cas contraire ; on ne peut conclure et la PCR pour la recherche de chlamydies peut être une alternative intéressante. (8)

En cas de suspicion clinique de chlamydiose, il est possible de réaliser un diagnostic thérapeutique par l'administration de doxycycline pendant trois semaines.

1.2.3.2 Calicivirose

Les signes cliniques décrits vont de l'absence de signes cliniques à un jetage nasal séreux en l'absence de toux, à la formation de vésicules sur la muqueuse orale, de la langue, du palais dur, vésicules se rompant facilement et produisant des lésions ulcérées bien délimitées. (19)

Même si des cas de conjonctivite ont été rapportés chez des chats infectés par un calicivirus (FCV), les cas de conjonctivite sans autres signes cliniques sont rares(19). Ramsey (19) rapporte que des expériences d'infection par le calicivirus ont été réalisées sur huit chats. On note l'apparition d'un écoulement oculaire séreux à muco-purulent cinq à quatorze jours après l'infection chez trois chats. La quantité de FCV, mesurée par PCR, n'est pas corrélée à l'intensité de la conjonctivite.

Dans le cas d'une infection par un calicivirus, des symptômes buccaux sont associés aux symptômes oculaires : ulcères buccaux ou stomatite lymphoplasmocytaire. Enfin, la conjonctivite n'est jamais associée à des lésions cornéennes.

1.2.3.3 Association à d'autres viroses

La co-infection par le HVF1 et le virus de l'immunodéficience féline ou de la leucose féline conduit à une récurrence plus fréquente des épisodes de conjonctivite (10). Il est toujours conseillé de pratiquer les tests sanguins de détection des virus du FIV et du FeLV conjointement aux autres tests lors de conjonctivite récidivante.

1.2.3.4 Mycoplasmoses

Ce sont des affections très rares chez le chat. (9) L'affection fongique la plus fréquente est l'infection par les cryptocoques.

L'affection est généralement unilatérale, et il s'agit le plus souvent d'une chorio-rétinite. Si elle est touchée, la conjonctive apparaît inflammée et épaissie. En l'absence de traitement, il y a toujours une aggravation des signes cliniques, contrairement à ce qui se produit souvent lors d'herpès virose. Les lésions cornéennes sont rares. (9)

1.2.4 Intérêt des examens complémentaires chez les animaux de plus de six mois

Nous avons vu précédemment que la symptomatologie de l'atteinte oculaire par un herpès virus est non spécifique.

De plus, la kératite ulcéraire dont elle s'accompagne est une lésion courante en ophtalmologie féline, pouvant avoir de nombreuses causes, qu'elles soient mécaniques (corps étranger, cil ectopique, dermoïde cornéen), chimiques (détergents, shampoings, insecticides), infectieuses ou parasitaires, consécutives à une kérato-conjonctivite sèche.

Il faut noter que l'herpès virose oculaire est de très loin la première cause de kératite ulcéraire d'origine infectieuse chez le chat.

Mais les autres causes de kératite ne peuvent être exclues d'emblée, d'où l'intérêt de pratiquer des examens complémentaires.

Dans la batterie de tests disponibles en ophtalmologie, quels sont ceux qui présentent un intérêt ? C'est ce que nous allons tenter d'établir dans la partie suivante, en nous basant sur les données de la littérature.

1.2.4.1 Intérêt des colorants : fluorescéine et rose Bengale

- Test à la fluorescéine

La fluorescéine est un colorant hydrosoluble qui ne colore pas l'épithélium cornéen s'il est sain. En revanche, en cas d'atteinte de celui-ci, le colorant pénètre dans les cellules et le stroma est alors intensément coloré en vert. Il faut noter que l'utilisation d'une lampe munie d'un filtre au bleu de cobalt accentue cette coloration verte.

Mise en œuvre du test : on applique une goutte d'une solution de fluorescéine sur l'œil. Une minute après, l'excédent est retiré en appliquant une solution de sérum physiologique stérile. Le cul de sac conjonctival est alors séché et la cornée examinée.

Interprétation

Un résultat positif (présence d'une coloration verte de la cornée) indique la présence d'une lésion de l'épithélium cornéen (ulcère).

Si l'ulcère observé est un ulcère dendritique, ulcère qui est spécifique de l'infection par l'herpès virus (10), on a alors une forte suspicion d'herpès virose oculaire, mais seul l'isolement du virus permet d'affirmer ce diagnostic.

Il est important de souligner que seuls les résultats positifs à cette épreuve sont interprétables, en raison de l'existence d'un nombre important de faux négatifs.

De plus, les inflammations cornéennes chroniques avec vascularisation prennent également la fluorescéine, ce qui nuit à la spécificité de ce test.

Enfin, il faut savoir que la membrane de Descemet ne prend pas la fluorescéine.

Le test à la fluorescéine, simple à réaliser et peu coûteux, permet une première orientation diagnostique, mais sa sensibilité et sa spécificité ne permettent pas au clinicien ayant une suspicion d'herpès virose oculaire de s'arrêter là.

- Test au rose Bengale

L'application de rose Bengale permet l'identification d'ulcères dendritiques dont la profondeur est trop minime pour être visible après l'application de fluorescéine (10). En pratique, ce test dont l'action est irritante est peu fréquemment réalisé.

Notons que ces tests colorés doivent être effectués après l'écouvillonnage ou le passage de cytobrosse sur la cornée pour ne pas fausser les résultats des analyses ultérieures. Or, si le test rose Bengale est réalisé après l'écouvillonnage et le frottis cornéen, il sera positif. Il y a donc incompatibilité entre ces tests.

1.2.4.2 Cytologie sur frottis cornéen

La cytologie sur frottis conjonctival ne présente en général que peu d'intérêt, sauf dans le cas des primo-infections conjonctivales par le HVF1.

En effet, les inclusions intranucléaires de virus HVF1 apparaissent fréquemment lors de primo-infections, mais elles ne sont pas identifiables avec la coloration Wright-Giemsa utilisée en routine. (10)

Les neutrophiles sont les cellules inflammatoires prédominantes, mais elles sont couramment observées dans de nombreuses conjonctivites infectieuses. (10)

On fait donc appel à une modification de l'examen conjonctival par empreinte sur filtre cellulosique, en prélevant des cellules cornéennes. (7)

Mise en oeuvre

Les prélèvements sont réalisés sur l'animal vigile, après instillation d'un collyre anesthésique (Novésine ND). Le prélèvement est effectué sur un filtre circulaire d'acétate de cellulose dont les pores mesurent 0.22 mm de diamètre. Le disque présente une face lisse, brillante et une face rugueuse et mate. Cette dernière est apposée pendant trente secondes sur la cornée, puis elle est posée sur une lame de verre solidarisée par deux clips. La fixation se fait par immersion dans du formol à 10% pendant au moins une heure. La coloration est celle de Papanicolaou modifiée.

Résultats

- cornée normale

On observe uniquement des cellules pavimenteuses superficielles, dont le noyau est rond, le cytoplasme ovalaire ou discrètement polyédrique, le rapport nucléoplasmique bas. Les cellules sont jointives et présentent une grande uniformité de taille. On ne rencontre pas d'éléments inflammatoires. (7)

- cornée souffrante

Le HVF1 se développe dans l'épithélium et entraîne la formation de vésicules puis d'ulcérations et une désorganisation cellulaire. On retrouve dans les cellules des inclusions basophiles caractéristiques. (8)

1.2.4.3 Immunofluorescence

L'utilisation des anticorps immunofluorescents est une pratique courante pour confirmer une infection par le HVF1.

La plupart des laboratoires utilisent la méthode indirecte, dans laquelle le spécimen de l'échantillon réagit avec un anticorps polyclonal non conjugué.

Cependant, cette technique est peu sensible : dans des infections par le HVF1 induites expérimentalement, l'immunofluorescence ne donnait de résultats positifs que dans les six premiers jours suivant l'infection. Dans le cas de conjonctivites chroniques où une infection par le HVF1 était suspectée, seuls 8.8 % des prélèvements se révélèrent positifs à l'immunofluorescence. Enfin, une comparaison des techniques d'isolement viral et d'immunofluorescence sur des raclages cornéens a montré que si 95% des échantillons étaient positifs par la technique de l'isolement viral, seuls 20% l'étaient par immunofluorescence (10).

1.2.4.4 Isolement viral

Les prélèvements sont cultivés sur des cellules de rein de chat dites de Crandell-Reese, à 37° Célcius et dans 5% de CO₂.

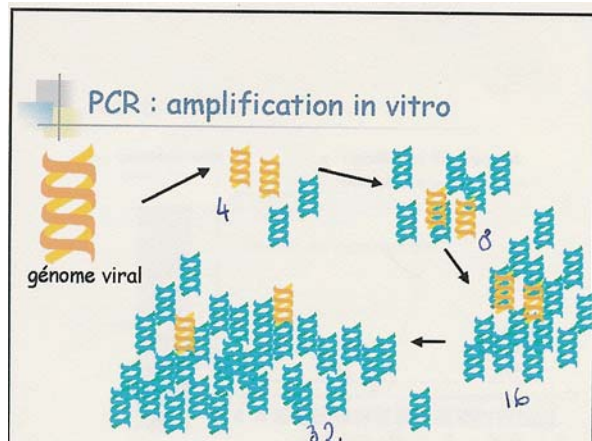
La culture est alors observée quotidiennement jusqu'à l'apparition des effets cytopathiques, pendant un minimum de dix jours. (4)

Avant l'apparition de la PCR, ce test était considéré comme étant le plus sensible de tous les tests. Cependant les difficultés techniques liées à la conservation des prélèvements le rendent difficilement utilisable en pratique courante.

1.2.4.5 Réaction de polymérisation en chaîne : PCR

Il s'agit d'amplifier in vitro un fragment de l'ADN viral afin d'en obtenir plusieurs millions de copies.

Figure 7 : la PCR, une amplification in vitro
D'après Boucraut, (3)



Dans le cas du HVF1, le fragment utilisé pour l'analyse est le gène de la thymidine kinase, qui compte 320 paires de bases. (11)

C'est cette réaction dont nous souhaitons tester l'intérêt, dans le cadre de notre étude.

1.2.4.5.1 Traitement de l'échantillon prélevé

Un traitement permet la lyse des cellules et la libération des virions, c'est l'extraction.

Elle consiste à « placer les cellules dans un tampon de lyse en présence de protéinase K, puis à transférer le lysat dans une colonne contenant une souche de fibre de verre. Les acides nucléiques libérés se lient alors spécifiquement à la surface de fibres de verre en présence d'un sel. La réaction de liaison se produit en quelques secondes grâce à la perturbation de la structure organisée des molécules d'eau et de l'interaction avec les acides nucléiques. Ainsi, l'adsorption sur les fibres de verre est favorisée. Les acides nucléiques sont alors purifiés des sels, des protéines et des autres impuretés cellulaires par une phase de lavage et sont éluées par un tampon d'éluion. L'ensemble de ces opérations est effectué sur une colonne de centrifugation. » (Montaut L., Mise au point d'une technique d'amplification génique pour la recherche diagnostique de l'herpès virus félin. Thèse TOU 2002 n° 62)

L'ADN viral est ainsi libéré et accessible pour la suite des manipulations.

1.2.4.5.2 Technique de polymérisation in vitro

Les différents composants de la réaction sont mis en contact, il s'agit :

- de l'échantillon pré-traité ;
- des amorces ;

Ce sont de courtes séquences de nucléotides d'environ 20 à 25 paires de bases, complémentaires des deux extrémités de l'ADN cible.

- des précurseurs deoxynucléotidiques (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ;
- de la Taq ADN polymérase, une enzyme thermorésistante extraite d'une bactérie vivant dans des sources chaudes ;
- de la solution tampon.

La concentration en ions magnésium est vérifiée très précisément puisque ceux-ci sont indispensables au bon fonctionnement de la réaction et qu'ils représentent un facteur critique de l'amplification.

Le principe de la réaction repose sur l'alternance cyclique de trois étapes. Chaque cycle dure environ une minute et trente secondes et les trois étapes sont les suivantes :

- Phase de dénaturation

La chaleur est utilisée pour séparer les deux brins de la double hélice d'ADN, par destruction des liaisons hydrogène. C'est à ce moment de la réaction que l'on applique la température la plus élevée, soit 94° C. Cette température est supérieure à la température de dénaturation de l'ADN (T_m) et elle permet l'obtention d'ADN simple brin.

- Phase d'hybridation des amorces

Les amorces permettent de déterminer les bornes de la séquence à amplifier. La température à ce moment de la réaction varie entre 45 et 70° C en fonction de la longueur des amorces et de leur séquence.

- Phase d'élongation

C'est la synthèse d'un nouveau brin d'ADN dans le sens 5'-3' par la Taq polymérase. La température optimale de cette dernière phase est de 72° C.

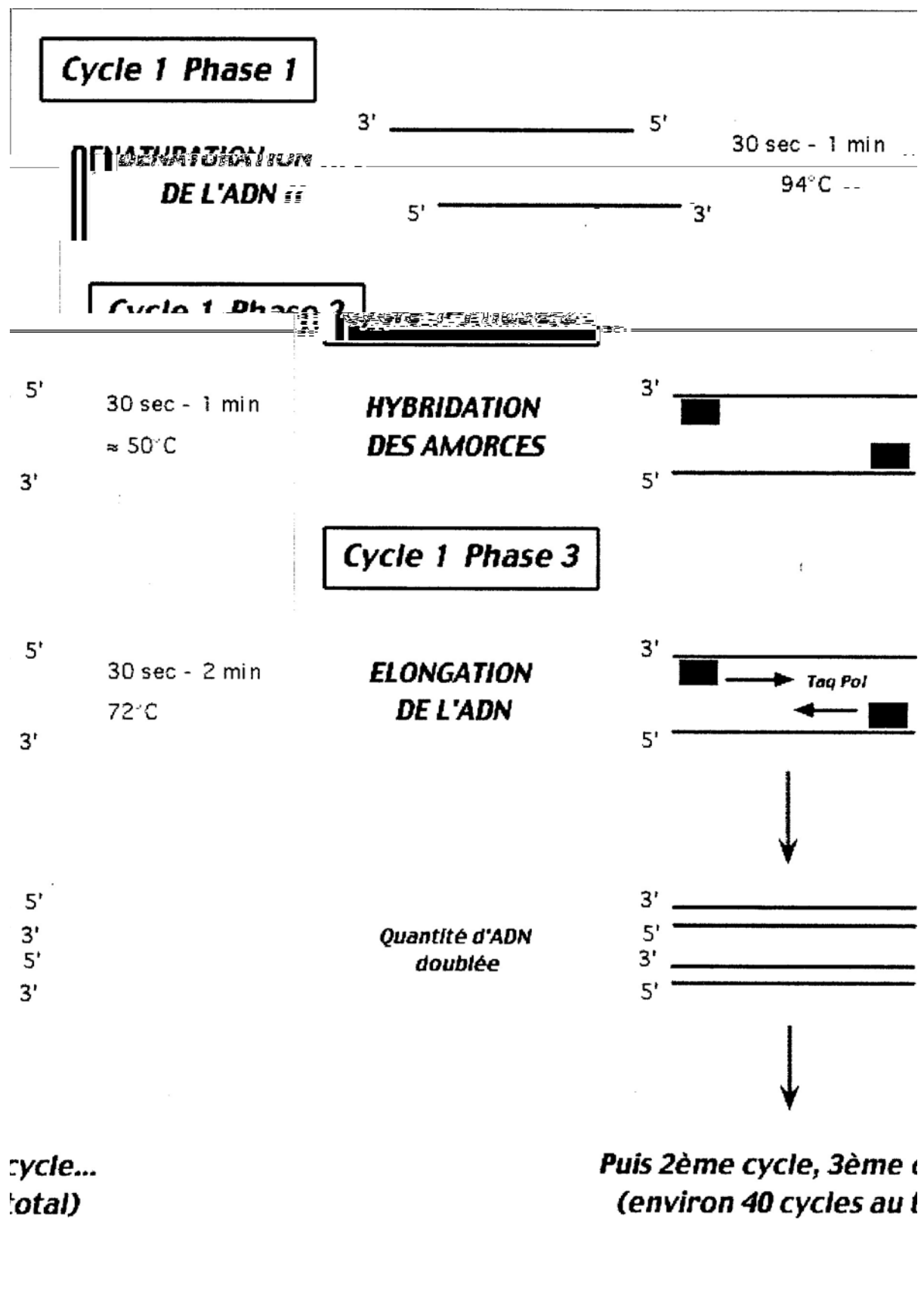
Ce cycle est répété 20 à 40 fois en moyenne.

A chaque cycle, le nombre de copies est doublé. Le rendement de la réaction est ainsi de 2^n copies au bout de n cycles. Il convient cependant de tempérer ce rendement théorique car d'une part le rendement même de chaque cycle n'atteint jamais 100%, et d'autre part on assiste, à la fin de la réaction, à un phénomène de plateau. Il n'est pas possible de préciser le nombre de cycles au bout duquel s'instaure ce phénomène car il est très variable et il dépend du nombre de cibles au départ. Ce phénomène peut s'expliquer de plusieurs manières, en particulier par la diminution de la quantité d'enzyme disponible et par l'inactivation progressive des réactifs.

Les produits obtenus sont révélés à la fin des cycles. La révélation s'effectue par électrophorèse (migration en gel d'agarose, fonction de la taille des fragments amplifiés), ce qui est une technique qualitative ou par hybridation fluorescente dans le cadre de la PCR en temps réel, technique quantitative.

Figure 8 : principe de la méthode PCR classique

D'après Cavène (5)



2. Etude du diagnostic de l'herpès virose par la méthode PCR

2.1 Méthode - Mode opératoire

2.1.1 Animaux

Les prélèvements sont réalisés sur des animaux présentés en consultation spécialisée d'ophtalmologie à l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort entre décembre 2000 et juillet 2002.

C'est, dans tous les cas, une suspicion d'herpès virose face à un tableau clinique évocateur qui a conduit à réaliser cet examen complémentaire.

2.1.2 Matériel

L'échantillon analysé par PCR est un support biologique constitué par un frottis conjonctival ainsi qu'un raclage cornéen.

Ceux-ci sont obtenus de la manière suivante :

- Une goutte d'un anesthésique local est instillée dans les deux yeux, puis une cytobrosse stérile à usage unique est appliquée sur la conjonctive, au niveau du cul de sac inférieur, avec un mouvement circulaire afin de recueillir des cellules conjonctivales. La cytobrosse est alors placée dans un tube sec et envoyée au laboratoire Scanelis de Toulouse.
- En cas de kératite, on réalise également un calque cornéen en déposant un calque hydrophile sur la cornée. Ce calque est laissé en place durant une minute. Ceci permet d'augmenter le nombre de cellules sur le prélèvement.

- En cas de séquestre cornéen, le séquestre est lui aussi prélevé et envoyé au laboratoire pour y être analysé. Il faut toutefois savoir que l'on ne retrouve pas de virus au niveau des cellules nécrosées.

Le grand avantage de cette méthode réside dans la facilité de la réalisation et de la conservation des prélèvements, ainsi que dans l'obtention rapide des résultats (48 heures).

2.1.3 Méthode

2.1.3.1 Traitement du prélèvement

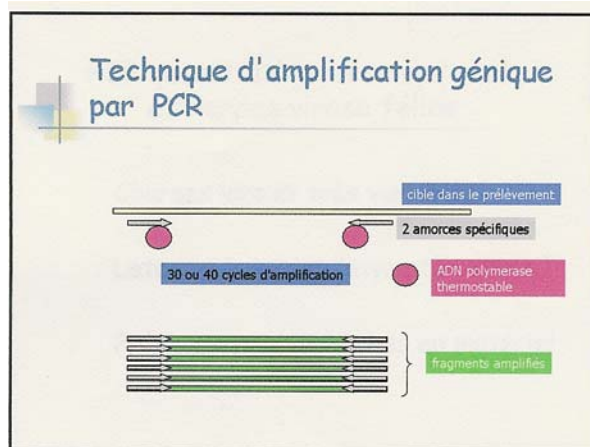
Le prélèvement envoyé au laboratoire Scanelis est traité de manière classique, comme cela a été décrit en première partie de notre étude, afin de libérer l'ADN viral.

2.1.3.2 Polymerase chain reaction ou polymérisation in vitro

Au cours de notre étude, deux techniques différentes de PCR ont été employées par le laboratoire Scanelis. En effet, la technique évoluant rapidement dans le domaine de la PCR, les premiers prélèvements ont été traités par PCR nichée, tandis qu'à partir de mars 2001, les prélèvements ont été traités par PCR en temps réel avec sonde Taqman. Cette dernière technique présente l'intérêt d'être quantitative et non plus qualitative comme la précédente.

Figure 9 : technique d'amplification génique par PCR

D'après Boucraut (3)



Pour la détection des Herpès virus, la séquence amplifiée est une partie du gène de la thymidine kinase (TK) : en effet, c'est une constante du génome viral. La comparaison du gène TK de l'Herpès virus félin avec des séquences du même gène issues d'autres herpès virus montre que ces gènes sont fortement divergents.(Nunberg 1989)

2.1.3.2.1 La PCR nichée

Pourquoi la PCR nichée ?

Elle permet une augmentation de la sensibilité analytique par rapport à la PCR classique grâce à la diminution du seuil de détection.

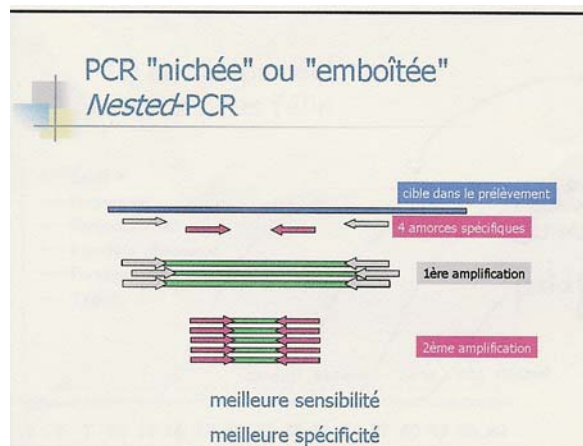
Cette technique est une évolution de la technique de PCR classique qui permet de limiter un des inconvénients majeurs de cette technique, c'est-à-dire l'hybridation parasite et donc d'augmenter la spécificité.

En effet, on sait que les amorces spécifiques de la séquence à amplifier sont courtes et qu'il peut donc arriver qu'elles s'hybrident ailleurs que sur leur cible. Pour pallier cet inconvénient, on procède comme nous l'avons expliqué précédemment pendant 20 à 40 cycles puis on transfère un échantillon de l'amplificat dans un tube où une nouvelle PCR est mise en œuvre, mais avec deux amorces internes aux deux premières amorces utilisées. L'élément amplifié est donc plus court que précédemment et comme on utilise quatre amorces contre deux pour la technique classique, la spécificité est améliorée. De plus, le nombre de cycles est augmenté

(on réalise deux cycles de PCR successifs), et de ce fait la sensibilité de cette méthode est augmentée. (5)

Figure 10 : La PCR nichée

D'après Boucraut (3)



Stiles (22) rapporte les résultats d'une étude comparative qu'il a réalisée entre la sensibilité de la PCR classique et de la PCR nichée, illustrant la meilleure sensibilité de cette dernière.

Tableau 1 : Comparaison des résultats positifs en PCR classique et en PCR nichée sur des échantillons extraits de chats sains, à conjonctivites ou à séquestre cornéen. D'après Stiles (22)

	Nombre d'échantillons positifs en PCR	Nombre d'échantillons positifs en PCR nichée
Frottis conjonctivaux sur 50 chats sains	0	6
Frottis conjonctivaux sur 50 chats présentant une conjonctivite	9	27
Produit de kératectomie sur 13 chats sains	1	6
Produit de kératectomie sur 28 chats présentant un séquestre cornéen	0	3

Aujourd'hui, au laboratoire Scanelis, il n'y a qu'une réaction de PCR (soit une cinquantaine de cycles d'amplification) mais la révélation se fait avec une hybridation fluorescente (sonde Taq-man), qui est une hybridation en temps réel.

2.1.3.2.2 La PCR en temps réel avec sonde Taqman

Dans cette technique, une sonde fluorescente appelée sonde Taqman s'hybride sur les produits de PCR durant l'amplification.

Cela permet alors de mesurer la fluorescence de la sonde à chaque cycle d'amplification, grâce à un logiciel spécifique et d'éviter ainsi le temps de révélation des produits de la PCR. La technique et les composants de la réaction sont les mêmes que dans la PCR classique (deux amorces, tampon, MgCl₂, Taq polymérase), auxquels on ajoute une sonde bi-fluorescente (marquée en 5' par un fluorophore dit reporter et en 3' par un fluorophore jouant le rôle de

quencher). La sonde est positionnée entre les deux amorces et correspond à une partie du génome très conservée. Si la séquence cible recherchée est présente dans le prélèvement, la sonde s'hybride avec cette séquence. La Taq polymérase, qui possède une activité 5' exonucléasique va hydrolyser la sonde à partir de son extrémité 5' et ainsi libérer le reporter qui pourra émettre sa fluorescence. Ce mécanisme permet d'expliquer l'absence totale de bruit de fond si la PCR ne fonctionne pas.

Les principaux avantages de cette technique sont les suivants :

- ❖ l'amplification d'un fragment très court donc une PCR très efficace (d'où un très bon seuil de détection, souvent plus faible que celui de la PCR nichée
- ❖ une analyse très simple des résultats en temps réel (les mesures de fluorescence sont effectuées par l'appareil à chaque cycle de PCR) qui permet également d'obtenir des résultats quantitatifs (analyse du cycle seuil par rapport à des standards).
- ❖ l'absence de traitement des échantillons en post-PCR (pas d'électrophorèse) : les tubes ou plaques de PCR ne sont pas ouverts et les risques de contamination post-PCR sont éliminés.

Figure 11 : Principe de la sonde Taq Man

D'après Cavène (5)

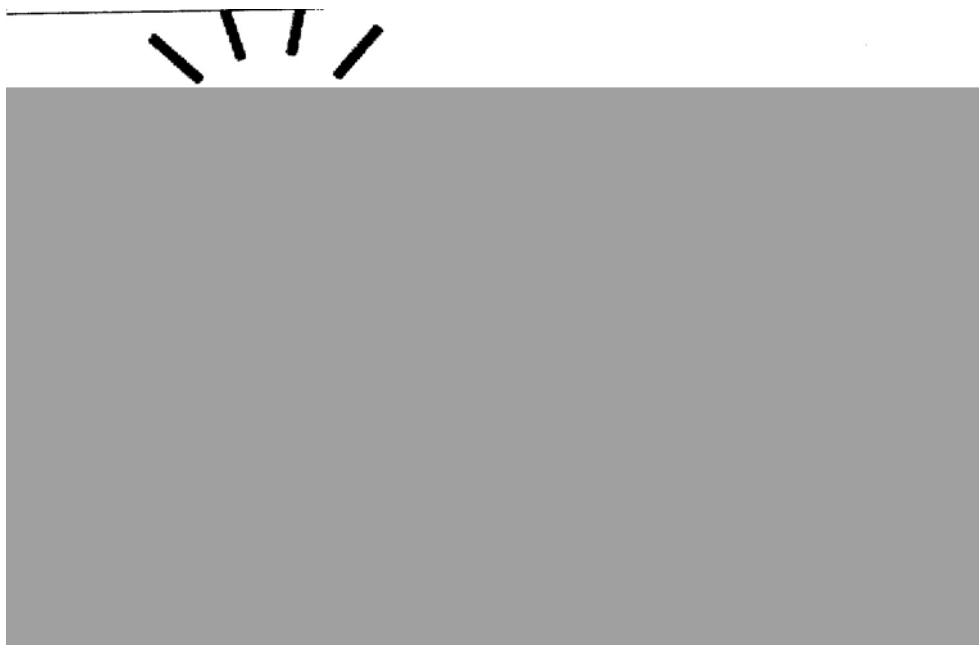
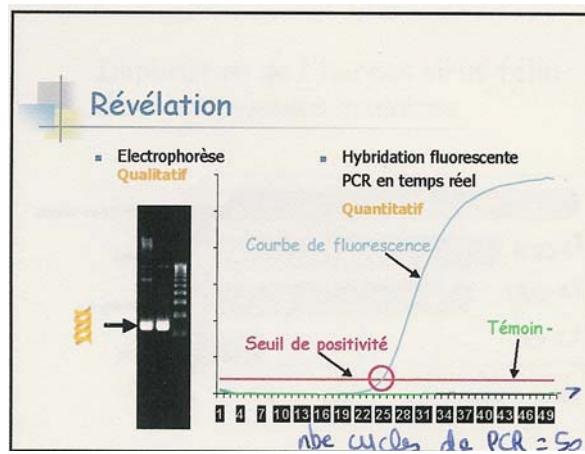


Figure 12 : Comparaison des deux techniques de révélation de la PCR

D'après Boucraut (3)



2.2 Résultats

2.2.1 Résultats

Sur 35 chats ayant subi un prélèvement, 12 se sont révélés positifs. L'intégralité des résultats, ainsi que les symptômes ayant conduit à la réalisation de l'analyse sont présentés en annexe.

Tableau 2 : Comparaison des symptômes de l'ensemble de la population testée avec ceux des animaux positifs

Symptômes	Ensemble de la population	Animaux positifs
-----------	---------------------------	------------------

En effet, si N est la population totale de chats présentant des symptômes compatibles avec une herpès virose, notre effectif est $n = 35$ chats.

Soit p la proportion d'animaux ayant une réponse positive au test. Ici, $p = 0.34$

Pour que les lois statistiques soient applicables, il faut que $np > 5$, $nq > 5$ avec $q = 1 - p$ et $n/N < 10\%$

Ces conditions sont bien remplies ici, et la taille de notre échantillon est suffisante.

Un tableau clinique de kératite avec ulcère, de conjonctivite, accompagnée(s) de douleur et de larmoiement, doit conduire à procéder à une analyse afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une herpès virose.

2.2.2 Limites

La taille de notre échantillon, trente-cinq chats, est relativement faible, et l'étude aurait sans nul doute gagné à être réalisée sur un nombre plus important d'animaux. En effet, la taille de l'échantillon peut constituer un biais important.

Il est fort dommage que le statut vaccinal des animaux soit inconnu, et qu'il ne soit pas systématiquement demandé lors de la consultation, car cela nous aurait permis de vérifier si dans le cas présent, les récurrences sont moins fortes et de moindre ampleur chez les chats vaccinés, comme cela est dit dans la littérature.

D'autre part, on peut regretter que les prélèvements ne soient pas identifiés par œil plutôt que par animal. En effet, cela nous aurait permis, lors de résultats positifs, de vérifier si le virus était retrouvé dans un œil ou dans les deux.

Il est important de noter que la technique de PCR a été modifiée au cours de l'étude, et que la sensibilité des deux techniques employées n'est pas la même (5). Ceci peut engendrer des biais dans notre étude.

Enfin, il aurait été intéressant de réaliser un second prélèvement après traitement, pour profiter des avantages de la PCR quantitative et suivre l'évolution de la charge virale.

Proposition d'un formulaire à remplir en consultation en cas de suspicion d'herpès virose, pour une étude prospective.

1) Identification du chat

- race
- âge
- sexe

- Conjonctive

	Œil droit		Œil gauche	
	Oui	Non		
Conjonctivite				
Chémosis				

- Nictitante

5) Examen de l'œil

- Cornée

	Œil droit		Œil gauche	
	Oui	Non	Oui	Non
Oedème				
Néovascularisation				
Pigmentation				
Ulcère. Forme et type				
Séquestre cornéen				

- Chambre antérieure/ iris
- Cristallin
- Fond d'œil

6) Examens complémentaires

- Test à la fluorescéine/ rose Bengale
- Cytologie
- Immunofluorescence
- Isolement viral
- PCR. Identification des prélèvements par œil

7) Commentaires

2.3 Discussion

Nous avons pu, grâce à l'importance de la structure du service d'ophtalmologie de l'école vétérinaire, étudier un nombre relativement important d'animaux ayant une symptomatologie compatible avec une herpès virose. En cela, notre objectif est atteint.

Cependant, nous avons vu qu'il existait de nombreuses limites à notre travail et nous avons fait des propositions en vue d'améliorer une étude qui pourrait être faite sur ce même sujet.

Discutons maintenant de ces résultats, et comparons-les aux données de la littérature.

2.3.1 Discussion des résultats liés au sexe de l'animal

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence entre le taux de positivité des mâles et des femelles. Ce résultat diffère de ce qui a pu être observé dans d'autres études. La thèse de M. Cavène, réalisée sur des chats cliniquement sains, montre une prévalence plus élevée de l'infection au sein de la population mâle. Si, comme cela est indiqué dans le Bulletin annuel des sociétés d'ophtalmologie de France de 1983, on ne note pas, dans la population humaine, de différence de prévalence liée au sexe, ce même rapport indique que chez l'animal on a noté des différences : « chez l'animal, il est classiquement admis que les femelles possèdent une immunité non spécifique plus efficace que les mâles, peut-être grâce à l'action stimulante des oestrogènes sur les cellules du système réticulo-endothélial » (1), ce qui expliquerait que les mâles soient plus touchés.

2.3.2 Comparaison avec les méthodes de diagnostic employées précédemment

Dans notre étude, sur toutes nos suspicions d'herpès virose, seules 35 % ont été confirmées. Il aurait été intéressant de comparer la PCR avec les techniques employées précédemment. Cela a été fait aux Etats-Unis par différentes équipes de chercheurs.

2.3.2.1 Différence de sensibilité entre la culture virale et la PCR pour la détection de l'HVF-1 chez des chats vaccinés ou non

Article publié par J.E. Sykes, G.F. Browning, V.P. Studdert, H.V. Smith dans *Archeological Virology* en 1997. (25)

La sensibilité diagnostique de ces deux méthodes est comparée chez cinq chats vaccinés et trois chats non vaccinés. Les huit chats sont infectés expérimentalement par le HVF-1.

Il apparaît qu'il existe une différence statistiquement significative entre la sensibilité de la PCR et de la culture chez les chats vaccinés alors qu'il n'y en a pas chez les chats non vaccinés.

Tableau 3 : comparaison de la sensibilité de la PCR et de l'isolement viral chez des animaux présentant des symptômes

	PCR		Isolement viral	
	Vaccinés	Non vaccinés	Vaccinés	Non vaccinés
Sensibilité	55.6	96.8	14.8	80.6

Il ressort de cette étude que la prévalence de l'infection chez les chats vaccinés est largement sous-estimée.

2.3.2.2 Comparaison de la PCR, de l'isolement viral et de l'immunofluorescence indirecte pour la détection d'herpès viroses spontanées

Article publié par Kent M. Burgesser, Stephanie Hotaling, Anita Schiebel, Scott E. Ashbaugh, Steven M. Roberts, James K. Collins, dans le *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* en mars 1999. (4)

L'objectif de l'étude est de comparer les trois méthodes pré-citées sur des animaux présentant une infection apparue spontanément. L'hypothèse est que la PCR est un test plus sensible que

chacune des deux autres méthodes et qu'elle devrait donc être la technique de choix pour détecter l'herpès virus félin lors de suspicion clinique.

Tableau 4 : Résultats de la PCR, de l'IV et de l'IFA sur 295 prélèvements oculaires de chats

Résultat du test	Signes cliniques d'HVF	
	Présents	Absents
PCR positive	29 (13.7%)	26 (30.9%)
IV positif	18 (8.5%)	9 (10.7%)
IFA positive	16 (7.5%)	9 (10.7%)
Négatif	182 (86.3)	57 (67.8%)
Nombre total d'échantillons	211	84

Cette étude démontre la supériorité de la PCR sur les autres méthodes employées couramment. Ainsi, la PCR apparaît capable de détecter l'infection presque deux fois plus fréquemment que l'isolement viral, technique considérée jusque là comme la plus sensible. Ces conclusions font de la PCR un test de choix pour la détection des herpès viroses. Les auteurs expliquent ainsi la supériorité de la PCR sur les autres techniques :

- L'isolement viral présenterait un défaut de sensibilité lié à la destruction de l'enveloppe virale durant le transport du virus, à l'inactivation de l'infectivité du virus par des enzymes ou des anticorps présents dans la salive ou dans les larmes, et à la présence de particules virales immatures dont l'infectivité n'est pas complète.
- La détection de l'immunofluorescence liée à la présence d'herpès virus serait quant à elle compliquée par les faibles quantités d'antigènes viraux présentes, par la présence d'anticorps et de médiateurs de l'inflammation dérivés de l'hôte, augmentant ainsi la probabilité d'obtenir des faux-positifs. De plus, l'immunofluorescence indirecte est un test très subjectif, car sa lecture dépend de l'interprétation des bandes faite par le manipulateur.

Tableau 5 : Comparaison des résultats de la PCR avec ceux de l'IV et de l'IFA

Résultats du test	PCR		Total
IV	Positif	Négatif	
Positif	27	0	27
Négatif	28	240	268
Total des échantillons	55	240	295
IFA			
Positif	16	9	25
Négatif	39	231	270
Total des échantillons	55	240	295

Les auteurs soulignent également que la prévalence de l'infection chez les animaux suspects cliniquement est nettement inférieure à celle qui a été observée dans une étude publiée par Stiles en 1997 dans l'*American Journal of Veterinary Research* (13.7 contre 54%).

2.3.2.3 Diagnostic de l'infection par l'herpès virus félin par immunohistochimie, PCR et hybridation in situ

Par A . Suchy, B. Bauder, W. Gelbmann, C.V. Löhr, J.P. Teifke, H. Weissenböck publié dans le *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* en 2000. (23)

Il s'agit de rechercher le virus chez un chat présentant une blépharite purulente et nécrosante, une conjonctivite, une rhinite purulente, une glossite nécrosante et une dermatite. Ce chat a été testé positif pour le FIV et le FeLV. Comme dans les autres études, la PCR apparaît plus sensible que les autres méthodes.

Cependant, les auteurs concluent leur étude en affirmant que l'utilisation de la PCR seule ne leur paraît présenter qu'une valeur clinique limitée en raison de l'existence d'un grand nombre de chats porteurs latents du HVF-1. Ils pensent en effet qu'il est possible que soient

attribués à une infection par le HVF-1 des symptômes liés en fait à une co-infection par un autre agent pathogène.

On voit donc que comme toute méthode nouvelle, la PCR ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique. En effet, si tous s'accordent sur le fait que cette méthode présente une sensibilité bien supérieure aux méthodes employées précédemment pour le diagnostic de l'herpès virose du chat, certains craignent que cette grande sensibilité ne conduise à des erreurs par excès dans le cas de l'herpès virose. Pour ces auteurs, le risque est d'attribuer à l'infection par le HVF-1 des symptômes liés à une autre maladie chez des animaux porteurs latents, et donc asymptomatiques.

CONCLUSION

Nous avons vu que plusieurs examens complémentaires sont disponibles en cas de suspicion d'herpès virose oculaire. Des comparaisons ont été faites par différentes équipes de chercheurs entre les différents examens complémentaires et la PCR, la plus récente de ces méthodes de détection. Il en ressort que la PCR est la technique la plus sensible.

D'après notre étude, on peut supposer qu'elle est également très spécifique : en effet, sur l'ensemble de la population étudiée au cours de cette étude, seuls douze chats sur trente-cinq ont une réponse positive, alors que tous présentaient une symptomatologie compatible avec une herpès virose oculaire. Cette technique est d'autant plus intéressante qu'en association avec une révélation avec sonde Taq Man, elle permettrait de suivre l'évolution de la charge virale avec le traitement.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- BACH J.F., *Immunologie*, 1981, Ch 15, p. 484
- 2- BARNETT K.C. , CRISPIN S.M., 1998, *Feline ophthalmology*, London : Saunders, 1998, 88-103
- 3- BOUCRAUT C., Diagnostic moléculaire en ophtalmologie. Communication du 7 décembre 2001 à l'ENVA
- 4- BURGESSER K.M., HOTALING S, SCHIEBEL A, ASHBAUGH S.E., ROBERTS S.M., COLLINS J.K., Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections, *J Vet Diagn Invest*, 1999, **11**, 122-126
- 5- CAVENE M. A., *Etude du portage oculaire du virus herpès félin dans une population de chats sains : utilisation de la méthode PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan*, Thèse Méd. Vét., Toulouse, n° 16, 2001, 77 p
- 6- CHAUDIEU G. , Les kératites félines. Communication du 7 décembre 2001 à l'ENVA.
- 7- CHAUDIEU G., FONCK Y., Cytologie cornéenne chez le chat : résultats préliminaires, *PMCAC* ,1990, **25**, 503-508
- 8- CLERC B., *Ophtalmologie Vétérinaire*, 2^{ème} édition, Editions du Point Vétérinaire, 1996, 637 p
- 9- GIONFRIDDO J.R., Feline Systemic Fungal Infections, *Vet Clin North Amer : Small Anim Pract* , 2000, **30** : 1015-1028
- 10- GLAZE M.B., GELATT K.N. , *Veterinary Ophtalmology*, Third edition, Philadelphia : Lippicott Williams and Wilkins, 1999, 1543 p
- 11- HARA M., FUKUYAMA M. *et al*, Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction, *Vet Microbiol* ,1996, **48** : 345-352
- 12- HIRSH D.C., ZEE Y.C., *Veterinary Microbiology*, 1999, 359-360
- 13- MAGGS D.J., LAPPIN M.R.,NASISSE M.P. , Detection of feline herpesvirus specific antibodies and DNA in aqueous humor from cats with or without uveitis, *Am J Vet Res*, 1999, **60** : 932-936
- 14- NASISSE M.P., Feline Herpes Virus ocular disease, *Vet clin North Amer : Small Anim Pract*,1989, **20** : 667-680

- 15- NASISSE M.P. *et al*, Experimental ocular herpesvirus infection in the cat ; sites of virus replication, clinical features, and effects of corticosteroids administration, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989, **30** : 1758
- 16- NASISSE M.P., ENGLISH R.V., TOMPKINS M.G., GUY J.S., SUSSMAN W., Immunologic, histologic, and virologic features of herpesvirus- induced stromal keratitis in cats, *Am J Vet Res*, 1995, **56** : 51
- 17- MORAILLON R., LEGEAY Y., FOURRIER P. *et al.*, *Dictionnaire de thérapeutique canine et féline*, 4^{ème} édition, Masson, 1998
- 18- MURPHY F.A., GIBBS E.P.J., HORZINEK M.G. *et al*, *Veterinary Virology Third edition*, 1999, 301-316
- 19- RAMSEY D.T., Feline Chlamydia and Calicivirus Infections, *Vet clin North Amer : Small Anim Pract*, 2000, **30** : 1015-1028
- 20- SAURET J., L'œil et ses annexes in *Polycopiés de cours de la chaire d'anatomie de l'ENVA*, 1990
- 21- STILES J., Feline Herpes Virus, *Vet Clin North Amer : Small Anim Pract*, 2000, **30** : 1001-1014
- 22- STILES J., MACDERMOTT M., BIGSBY D., WILLIS M., MARTIN C., ROBBERTS W. *et al*, Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis, *Am J Vet Res*, 1997, **58** : 338-342
- 23- SUCHY A., BAUDER B., GELBMANN W., LOHR C.V., TEIFKE J.P., WEISSENBOCK H., Diagnosis of feline herpesvirus infections by immunochemistry, polymerase chain reaction, and in situ hybridization, *J Vet Diagn Invest*, 2000, **12** : 186-191
- 24- SYKES J.E., Feline upper respiratory tract pathogens : Herpesvirus 1 and Calicivirus, *The Compendium on Continuing Education*, 2001, **23** : 166-175
- 25- SYKES J.E., BROWNING G.F., ANDERSON G., STUDDERT V.P., SMITH H.V. , Differential sensitivity of culture and the polymerase chain reaction for detection of feline herpes virus 1 in vaccinated and unvaccinated cats, *Arch Virol*, 1997, **142** : 65-74
- 26- SYKES J.E., ALLEN J.L., STUDDERT V.P., BROWNING G.F., Detection of feline calicivirus, feline herpes virus 1 and chlamydia psittaci mucosal swabs by multiplex RT-PCR/ PCR, *Vet Microbiol*, 2001, **81** : 95-108

27-VOTGLIN A., FRAEFEL C., ALBINI S., LEUTENEGGER C.M., SCHRANER E., SPIESS B. *et al*, Quantification of feline herpes virus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time TaqMan PCR, *J Clin Microbiol*, 2002 , **40** : 519-523

ANNEXES

Annexe 1 Symptômes présentés par les patients

nom	Résultat PCR	Symptômes													
		Conjonctivite		Sécrétions		Ulcère		Blépharo- spasme		Néo- vascularisation		entropion		Autres	
		OD	OG	OD	OG	OD	OG	OD	OG	OD	OG	OD	OG	D	G
1	-					+						+	+	+	
2	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+				
3	-													+	+
4	+	+	+	+	+							+		+	
5	-			+	+	+	+								
6	+			+	+									+	+
7	-	+	+			+	+			+	+				
8	-	+	+		+		+								+
9	-	+	+	+	+										
10	+		+				+				+				+
11	-	+				+		+		+				+	+
12	+		+				+		+						+
13	-			+				+		+					+
14	+	+				+	+			+	+				
15	-	+				+								+	
16	-	+	+	+	+			+	+						
17	+		+				+			+	+				+
18	-		+				+					+			
19	-	+	+						+	+	+			+	+
20	-	+													
21	+			+	+	+			+	+				+	+
22	-													+	+
23	-				+						+				
24	+					+				+				+	

nom	Résultat PCR	Symptômes													
		Conjonctivite		Sécrétions		Ulcère		Blépharospasme		Néo-vascularisation		Entropion		Autre	
		OD	OG	OD	OG	OD	OG	OD	OG	OD	OG	OD	OG	D	G
25	+	+		+		+		+	+					+	
26	-			+										+	+
27	-					+									
28	+					+	+							+	
29	-													+	
30	-					+	+			+					
31	-						+							+	+
32	-	+		+				+							
33	-	+		+						+				+	
34	+			+		+	+							+	+
35	-						+								

Annexe 2 : sexe des patients

Nom	SEXE
1	Mâle
2	Mâle castré
3	Mâle castré
4	Mâle
5	Femelle
6	Femelle
7	Femelle
8	Femelle
9	Femelle
10	Mâle
11	Mâle
12	Mâle castré
13	Femelle castrée
14	Mâle castré
15	Femelle
16	Mâle
17	Mâle
18	Femelle castrée
19	Femelle
20	Femelle
21	Femelle
22	Femelle
23	Mâle
24	Femelle castrée
25	Mâle castré
26	Mâle castré
27	Mâle
28	Femelle castrée
29	Mâle
30	Femelle
31	Mâle castré

32	Femelle
33	Mâle
34	Femelle
35	Mâle castré